

Charakterisierung kleiner, nicht-kodierender RNAs in
Streptomyces coelicolor

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Nona Heueis

aus Frankfurt am Main

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 19.11.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2015

Darmstadt 2016

D 17

Edwin.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Beatrix Süß** für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrem Labor durchführen zu können. Ich wusste das freie und unabhängige Arbeiten jederzeit zu schätzen, ebenso wie die hervorragende Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft. Für die Gelegenheit an interessanten Tagungen und Konferenzen teilnehmen zu können, bin ich dankbar.

Frau **Prof. Dr. Felicitas Pfeifer** möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken. Unsere Gespräche haben mir immer neue, interessante Aspekte aufgezeigt.

Herrn **Prof. Dr. Jörg Soppa** danke ich recht herzlich für die Begleitung meines bisherigen akademischen Werdegangs. Die stete Hilfsbereitschaft und die guten Ratschläge haben mich immer voran gebracht. Vielen Dank.

Der **AG Süß** und den wechselnden Wegbegleitern der letzten Jahre danke ich für die vielen Gemeinsam- und einige Unstimmigkeiten. Es war eine aufregende Zeit.

Ein spezieller Dank geht an...

... **Katrin**. Für alles, seit vielen Jahren. Und hoffentlich noch mehr in der Zukunft.

... **Julia**. Für genau die richtigen Worte zur richtigen Zeit. Und Kino. Und essen gehen.

... **Michi**. Für unseren kleinen Strepto-Kosmos. Und Filme und Bücher und kochen.

... **Marc**. Für lustige Geschichten rund um Wein, Auto, Motorrad und Ski.

... **Martin**. Für ganz viele Tänze, Enten und die sich nie erschöpfende Hilfsbereitschaft.

... **Flo**. Für drei sehr hilfreiche Gefallen, Umzugshilfe und die kompetente Diskussionsbereitschaft.

... **Thea**. Für eine viel zu kurze, gemeinsame Zeit und unsere kleine Farm.

... **Britta & Britta**. Für eure Hilfe zu jeder Zeit auf eure ganz persönliche, wunderbare Weise.

... **Hermine**. Dank dir konnte ich endlich sehen, was ich schon lange wusste.

... **Patrick**. Für eine Heimat mitten im Chaos.

... **die Schabernackbrigade**. Für eine legendäre Geschichte.

... **meine Grobs**. Für Hilfe vor dem Untergehen. Ohne euch geht es nicht.

... **Stephi**. Für Rat und Tat und Zuspruch, wann immer nötig.

... **Erika**. Fürs immer da sein. Zu jeder Zeit, bei allem. Danke.

... **Veit**. Für einen langen, schwierigen Weg zusammen. Auf eine goldene Zukunft.

... **Tuchels**. Meiner Familie. Blut ist eben doch nur flüssig. Danke für alles.

... **Bommes'**. Meiner neuen Familienhälfte. Für Rückhalt zu jeder Zeit. (Und das viele Lesen, **Margit**.)

Ein ganz besonderer Dank gilt **Stefan**. Ohne den ich das letzte halbe Jahr nicht überstanden hätte und der mir mehr geholfen hat, als ich in Worte fassen kann.

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Taxonomische Einordnung der Streptomyceten	2
2.1.1	Actinobakterien.....	2
2.1.2	Die Gattung <i>Streptomyces</i>	2
2.2	<i>Streptomyces coelicolor</i>	6
2.2.1	Sekundärmetabolite <i>S. coelicolor</i>	6
2.2.2	Das Genom von <i>S. coelicolor</i>	7
2.3	Regulation der Genexpression	9
2.3.1	Genregulation durch nicht-kodierende RNAs	10
2.4	Ziel dieser Arbeit	26
3	Ergebnisse	28
3.1	sRNAs aus <i>S. coelicolor</i> dieser Arbeit	28
3.2	Untersuchung von sRNAs in <i>S. coelicolor</i>	29
3.2.1	Lokalisation der sRNA-Kandidaten im Genom	29
3.2.2	Vorhersage der Sekundärstrukturen der sRNAs	30
3.3	Konservierung der sRNAs innerhalb der Gattung <i>Streptomyces</i>	31
3.4	Expressionsanalyse in <i>S. coelicolor</i>	33
3.4.1	Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 unter Stressbedingungen	34
3.4.2	Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in verschiedenen Stickstoffquellen.....	35
3.5	Analyse der sRNAs mittels Überexpressions- und Deletionsmutanten	42
3.5.1	Herstellung der Überexpressionsmutanten.....	43
3.5.2	Herstellung der Deletionsmutanten.....	46
3.5.3	Übersicht der Erfolge der Plasmidherstellung	53
3.5.4	Nachweis des veränderten Expressionslevels der sRNAs im Northern Blot	54
3.6	Analyse der sRNA-Mutanten auf Festmedium.....	59
3.6.1	Stressbedingungen auf Festmedium.....	59
3.6.2	Unterschiedliche Voll- und Minimalmedien	64
3.6.3	Einfluss verschiedener Nährstofflösungen auf das Wachstum von <i>S. coelicolor</i>	70
3.6.4	Einfluss von Citrat auf die Überexpression von scr2952	72

3.7	Deletionsstämme der sRNAs scr4632 und scr6925	80
3.7.1	Phänotypische Besonderheiten der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 ..	80
3.7.2	Identifikation der sekretierten goldfarbenen Substanz	94
3.7.3	Genotyp der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925.....	101
4	Diskussion.....	108
4.1	Auswahl von sRNA-Kandidaten für diese Arbeit	108
4.1.1	Genomische Konservierung der sRNA-Kandidaten	109
4.1.2	Genomische Lage der sRNA-Kandidaten.....	110
4.1.3	Sekundärstrukturen der sRNA-Kandidaten	113
4.2	Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in Flüssigmedium.....	115
4.2.1	Stickstoffquellen.....	115
4.3	Wuchsanalysen auf Festmedium	116
4.3.1	Metallionenstress.....	116
4.3.2	Nährstofflösungen.....	117
4.4	Analyse der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925	118
4.4.1	Sekretion einer goldenen Flüssigkeit	118
4.4.2	Gegenseitige Beeinflussung von scr4632 und scr6925	119
4.5	Fazit und Ausblick.....	122
5	Material und Methoden.....	123
5.1	Materialien	123
5.1.1	Geräte und Verbrauchsmittel	123
5.2	Chemikalien.....	126
5.3	Medien	128
5.4	Verwendete Puffer und Lösungen	131
5.5	Enzyme	133
5.6	Antibiotika	134
5.7	Material zur Gelelektrophorese	134
5.8	Oligonukleotide	135
5.9	Plasmide	138
5.10	Bakterienstämme	139
5.11	Software	140
5.12	Methoden.....	140
5.12.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	140
5.12.2	<i>Escherichia coli</i> - spezifische Methoden.....	144
5.12.3	<i>Streptomyces coelicolor</i> - spezifische Methoden.....	146

5.12.4	RNA-spezifische Methoden	149
5.12.5	Protein-spezifische Methoden	157
6	Anhang	159
6.1	Abkürzungen	159
6.2	Einheiten und Dimensionen	161
6.3	Zusätzliche Abbildungen und Tabellen	162
6.3.1	Sekundärstrukturen der sRNAs	162
6.3.2	Konservierung der sRNAs in der Gattung <i>Streptomyces</i>	165
6.3.3	Inhaltsstoffe von Soja	170
6.3.4	Wuchsverhalten der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 mit verschiedenen Aminosäuren	173
6.3.5	Wuchsverhalten des Wildtyps auf Festmedium mit aufgelegter Folie	176
6.3.6	Massenspektrometrische Analyse der Proteinproben des Deletionsstamms von scr4632	177
7	Literatur	183
8	Curriculum Vitae	194
9	Publikationen	195
10	Vorträge und Posterbeiträge	195
11	Ehrenwörtliche Erklärung	196

1 Zusammenfassung

Die Fähigkeit von RNA-Molekülen die Regulation zellulärer Mechanismen zu steuern, wurde lange Zeit unterschätzt. RNA galt nur als Überträger von Information zwischen DNA und Proteinen. Nachdem zwischen 1954 und 1961 zunächst die Rolle der rRNA, später auch der tRNA und mRNA aufgeklärt wurde, überzeugte die Entdeckung der Selbstspaltkapazität von Ribozymen und von miRNAs schließlich vom regulatorischen Potential einer RNA ganz ohne involvierte Proteinfaktoren. (Brenner *et al.*, 1961; Hoagland *et al.*, 1958; Kruger *et al.*, 1982; Palade, 1955) Allein in *Escherichia coli* sind bis heute über 80 solcher regulatorischer RNA-Moleküle bekannt, im Menschen gibt es mehr als 1200 miRNAs. (Friedländer *et al.*, 2014; Raghavan *et al.*, 2011) Fast so groß wie ihre Anzahl ist auch die Vielfältigkeit ihrer Funktion. Sie regulieren die Transkription und die Translation, beeinflussen die mRNA-Stabilität und die Modulation von Proteinfunktionen.

Im Modellorganismus der Actinomyceten, *Streptomyces coelicolor*, wurden bereits Ansätze zur Identifikation von sRNAs unternommen, bei denen eine Vielzahl an sRNA-Sequenzen identifiziert wurde. Bisher konnten für diese drei Ziel-mRNAs validiert werden. (D'Alia *et al.*, 2010; Vockenhuber *et al.*, 2011; Vockenhuber & Suess, 2012)

In der hier vorliegenden Arbeit sollten sieben der elf in unserer Arbeitsgruppe identifizierten sRNAs aus *S. coelicolor* näher untersucht werden. (Vockenhuber *et al.*, 2011) Alle ausgewählten Kandidaten zeigten eine hochstrukturierte Faltung der sRNA-Sequenz. Ihre Expressionsmuster waren sehr unterschiedlich und reichten von einer sehr starken (scr2736) über eine sehr gleichmäßige (scr3920) Expression bis hin zu einer starken Abhängigkeit von der Wachstumsphase (scr2952, scr4115, scr4389, scr4632, scr6925). Die sRNA-Sequenzen waren innerhalb der Gattung *Streptomyces* sehr unterschiedlich konserviert. Scr2952 wurde in nahezu allen überprüften Streptomyceten-Arten nachgewiesen, scr4632 konnte dagegen nur in *S. coelicolor* identifiziert werden.

Die Expression der sRNA-Kandidaten und ihr Einfluss auf das Wachstum wurden unter verschiedenen Anzuchtbedingungen überprüft (verschiedene Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sowie Stressbedingungen). Keine der sRNAs reagierte mit eindeutigen Expressions- oder Wachstums-veränderungen auf die getesteten Konditionen. Die Erstellung von Überexpressionsmutanten konnte nur bei scr2952 unter Supplementierung von Citrat auf Festmedium ein verstärktes Wachstum induzieren. Die Ursache dieses Effekts konnte noch nicht geklärt werden.

Von den sRNAs scr4632 und scr6925 konnte im Laufe von zwei Jahren keine Deletion erhalten werden. Es erfolgte nur eine einfache Integration der Deletionslasamide, die doppelt homologe Integration der sRNA konnte jedoch nicht erreicht werden. Dies deutet auf eine essentielle Funktion hin. Der Genotyp beider Stämme wurde über Sequenzierung bestätigt und schloss eine unspezifische Integration der Plasmide aus. Die Stämme mit der einfachen Integration dieser beiden sRNAs zeigten einen ungewöhnlichen Phänotyp. Auf Festmedium sekretierten sie eine goldene Flüssigkeit in sehr großer Menge. Eine Northern Blot-Analyse mit den Überexpressionsstämmen von scr4632 und scr6925 konnte einen ersten Hinweis auf eine mögliche gegenseitige Beeinflussung dieser sRNAs liefern. In einer Proteomanalyse konnte das Protein BldKB als mögliches Ziel der sRNAs identifiziert werden.

Die weitere Untersuchung des beobachteten Phänotyps wird in Zukunft sehr spannend sein, da ein Regulationsmechanismus, der auf einer direkten gegenseitigen Beeinflussung zweier sRNAs beruht, bislang nicht beschrieben wurde.

2 Einleitung

2.1 Taxonomische Einordnung der Streptomyceten

2.1.1 Actinobakterien

Die heutige Einteilung der Actinobakterien in ihre Familien und Gattungen wurde in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts von Selman A. Waksman vorgenommen. Seine Studie führte 1943 die Gattung *Streptomyces* ein, um die immer größer werdende Anzahl und Wuchsvielfalt der Actinobakterien unterscheiden zu können. Um diese verschiedenen Wuchsformen differenzieren zu können, wurden Bakterien, die neben myzelartigen Zellgeflechten auch Sporen bildeten, einer neuen Gattung zugeordnet. (Waksman & Henrici, 1943) Zu dieser Gattung gehören Gram-positive Bakterien, die zumeist in aeroben Bodenhabitaten vorkommen und einen GC-Gehalt von etwa 70% GC-Basen im Genom aufweisen. (Anderson & Wellington, 2001; Stackebrandt & Woese, 1981) Diese in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts begründete Einteilung der Organismen wurde im Laufe der Zeit immer wieder verfeinert und mittels DNA-Analysen der 16S und 23S ribosomalen Untereinheit untermauert. (Witt & Stackebrandt, 1990)

Aufgrund ihrer Wuchsform wurden Actinomyceten anfangs zu den Pilzen gezählt. Die hyphenförmig wachsenden Zellgeflechte brachten ihnen deshalb die lateinische Bezeichnung „Strahlenpilze“ (Actinomyceten) ein. (Williams, 1990) Sie bilden vegetative Myzelien aus, mit denen sie in ihr Substrat einwachsen und die sie in einer späteren Phase der Entwicklung in Luftmyzelien umformen, um aus diesen Sporen abzuschneiden. (Erikson, 1948) Es gibt auch Ausnahmen dieser Wuchsform wie die Gattung *Mycobacterium*. Sie wächst in Form eines stäbchenförmigen Bakteriums und zeigt nur in seltenen Fällen ein geflechtartiges Filament. Die kokkoiden Zellen von *Micrococcus* weichen ebenfalls vom typischen myzelartigen Wachstum der Actinobakterien ab. (Hartmans *et al.*, 2006; McCormick & Flardh, 2012; Ventura *et al.*, 2007)

Besondere Bedeutung wird Actinomyceten zuteil, da sie eine enorm große Vielzahl an Sekundärmetaboliten produzieren. Nicht nur Antibiotika, die den größten Anteil produzierter Substanzen ausmachen, sondern auch Herbizide, Insektizide, Antitumor-Reagenzien, Antimykotika und eine Vielzahl weiterer biotechnologisch relevanter Sekundärmetabolite. Es wurden bereits über 10.000 biologisch aktive Substanzen aus Actinomyceten isoliert, wovon fast zwei Drittel durch die Gattung *Streptomyces* produziert werden. (Bérdy, 2005; Bibb, 1996)

Die Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* sind meist nicht-pathogen. Hauptsächlich in den Gattungen *Mycobacterium* und *Nocardia* finden sich pathogene Arten, während in der Gattung *Streptomyces* nur wenige Vertreter pathogene Eigenschaften besitzen. (Alam *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2007) *Streptomyces somaliensis* und *S. sudanensis* sind humanpathogene Erreger, *S. ipomoea* und *S. scabies* mit einigen eng verwandten Arten, die alle den Kartoffelschorf verursachen, sind Pflanzenpathogene. (Labeda & Lyons, 1992; Loria *et al.*, 2006; Quintana *et al.*, 2008)

2.1.2 Die Gattung *Streptomyces*

Streptomyceten, die größte Gattung der Actinobakterien mit aktuell über 900 bekannten Arten, kommen ubiquitär vor, stellen jedoch normalerweise typisch bodenbesiedelnde Bakterien dar. Ihr myzelartiges Zellgeflecht eignet sich optimal für die Besiedelung dieses Habitats und die Nährstoffaufnahme aus dem Substrat wird so erleichtert. (Goodfellow & Williams, 1983; Romero-

Rodriguez *et al.*, 2015) Vertreter der Gattung *Streptomyces* sind durch die Verwertung organischer Verbindungen wie Cellulose und Chitin eng mit dem von ihnen besiedelten ökologischen Gleichgewicht verbunden und vor allem für den Kohlenstoffkreislauf von immenser Bedeutung. (Bentley *et al.*, 2002; McCarthy & Williams, 1992; Schrepf, 2001; Ventura *et al.*, 2007) Mittlerweile sind auch marine Vertreter dieser Spezies bekannt. Trotz völlig anderer ökologischer Bedingungen dieses Habitats produzieren auch marin lebende Actinobakterien bioaktive Substanzen. Der Identifizierung dieser Sekundärmetabolite wird mit Spannung entgegengesehen, da sie aufgrund differenter Anforderungen der ökologischen Nische andere chemische Kapazitäten aufweisen könnten. (Hopwood, 2007)

Streptomyceten sind besonders gut an ihrem charakteristischen Geruch zu erkennen. Sie produzieren Geosmin. Dieser bicyclische Alkohol verursacht den typischen Geruch, der allgemein mit dem Geruch nach Waldboden assoziiert wird. (Jiang *et al.*, 2006)

2.1.2.1 Morphologie und Entwicklung

Exemplarisch für die Wuchsform der Actinomyceten soll hier der Lebenszyklus von *S. coelicolor* dargestellt werden. Er beginnt als monogenomische Spore, die während der Germination einen oder mehrere Keimschläuche ausbildet. Die apikal wachsenden Keimschläuche verlängern sich und es entstehen mehrere laterale Verzweigungen, die in das Substrat einwachsen. Dieses vegetative Substratmyzel wird auf ein Signal hin, unter anderem Nährstofflimitation im dichten Zellgeflecht, lysiert. Die durch den Abbau des Zellgeflechts gewonnenen Zellbestandteile werden verwendet, um das Luftmyzel zu errichten. Dieses ist weniger verzweigt als das vorangegangene Substratmyzel. Es ist vielmehr dazu konzipiert, aus dem Substrat emporzuragen. (Bentley *et al.*, 2002; Yagüe *et al.*, 2013) In Abbildung 2.1 sind die wichtigsten Stadien im Lebenszyklus anhand von mikroskopischen Bildern sowie einer Fotografie des Wachstums auf Festmedium dargestellt.

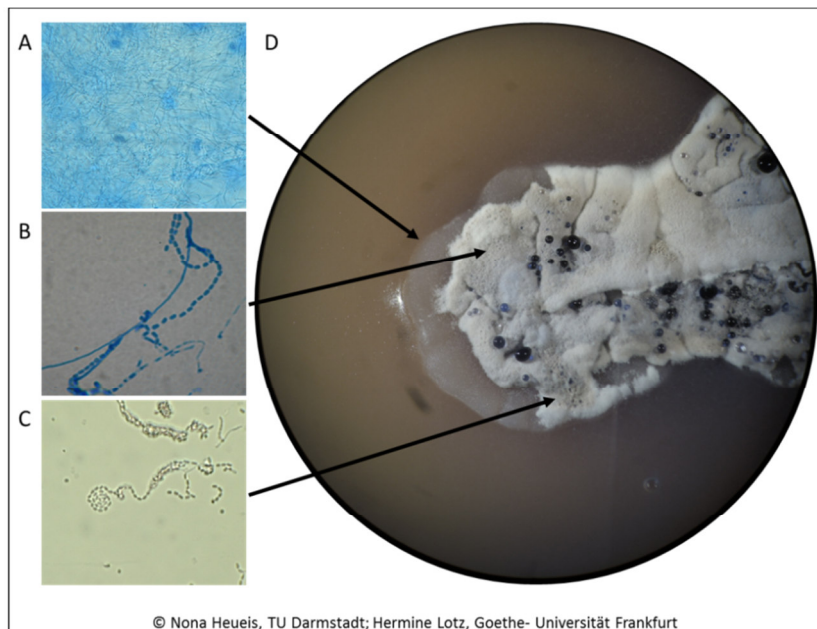


Abbildung 2.1: Wuchsphasen in *S. coelicolor*

A Vegetatives Myzel, 40x Vergrößerung. Das Präparat wurde mit Baumwollblau angefärbt. **B** Luftmyzel mit beginnender Sporenbildung, 100x Vergrößerung. Das Präparat wurde ebenfalls mit Baumwollblau gefärbt. **C** Bereich mit fertig ausdifferenzierten Sporen, 40x Vergrößerung. **D** *S. coelicolor*-Kolonie auf Soja-Mannitol-Festmedium. Die Pfeile markieren die, den Teilbildern entsprechenden, Phasen in der Kolonie. Actinorhodin wird von weiter ausdifferenzierten Zellen bereits produziert und sezerniert (blaue Tropfen).

In die Hyphen des Luftmyzels werden Septen eingezogen, welche die multigenomischen Zellen in einzelne monogenomische Kompartimente trennen. Durch Verdickung der Zellwand und das Einlagern von Pigmenten werden die Kompartimente zu singulären Sporeneinheiten ausdifferenziert (Abb. 2.2). (Jakimowicz *et al.*, 2005)



Abbildung 2.2: Bildung monogenomischer Sporen in *S. coelicolor*

Durch das Einziehen von Septen (schwarze Pfeile) werden die multigenomischen Luftmyzelien in monochromosomale Kompartimente unterteilt. Die Markierung entspricht 500 nm. Entnommen und bearbeitet nach Mazza *et al.*, 2006.

Der Verlauf des Wachstums von Luftmyzel und sich abschnürenden Sporen verläuft in Kaskaden. Wenn bereits Luftmyzelien errichtet und Sporen maturiert sind, wachsen nochmals Hyphen durch das Geflecht hindurch und schnüren erneut Sporen ab. (Ensign, 1978) Die Ausbildung dieser Verbreitungseinheit dient in hohem Maße der Persistenz der Art. Es konnten bereits 70 Jahre alte und dennoch lebensfähige Sporen aus Bodenproben isoliert werden. (Morita, 1985) Abbildung 2.3 zeigt ein mit elektronenmikroskopischen Bildern illustriertes Schema des Lebenszyklus.

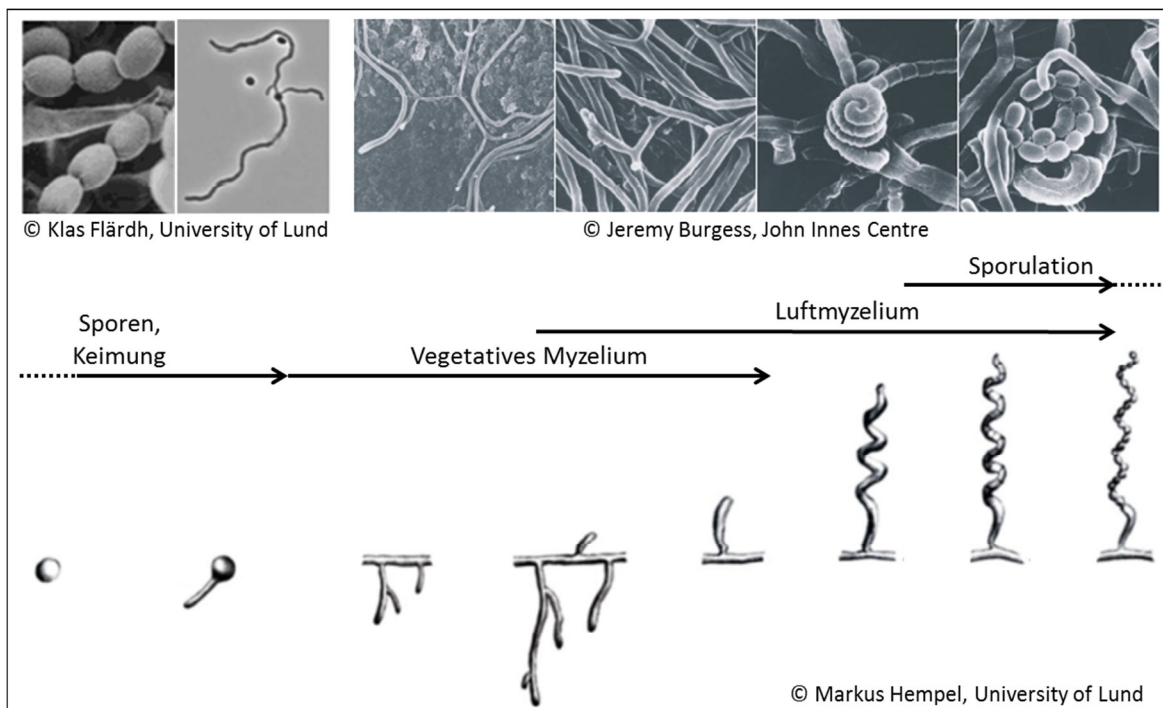


Abbildung 2.3: Lebenszyklus von *S. coelicolor*

Oben Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Zeitpunkte im Lebenszyklus. Aufgenommen wurden Bilder von Sporen, auskeimenden Sporen, vegetativem Myzel, Luftmyzelien und sich abschnürenden Sporen (v.l.n.r.). **Unten** Schema des Lebenszyklus in einzelnen Stadien. Quellen sind im Bild verzeichnet.

Es konnten bislang nur zwei Genklassen identifiziert werden, die an der Regulation dieses komplexen Zyklus beteiligt sind: Die *bld* und die *whi*-Gene. Der Name *bld* kommt vom englischen Wort *bald* (kahl). Deletionsmutanten dieser Genklasse bzw. einzelner *bld*-Gene sind nicht mehr in der Lage, das vegetative Myzel zu differenzieren und ein Luftmyzel zu errichten, weshalb dieser Phänotyp eine kahle Oberfläche zeigt (Abb. 2.4). Außerdem verfügen *bld*-Deletionsmutanten über eine Störung von Nährstoffeinlagerung und Antibiotikasynthese. (Elliott *et al.*, 1998)

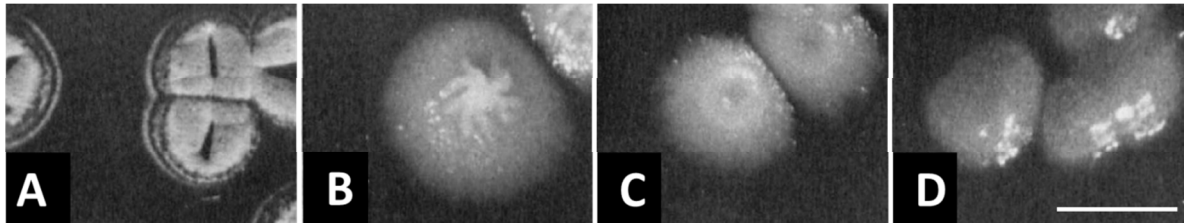


Abbildung 2.4: Einfluss der *bld*-Gene auf das Wachstum von *S. coelicolor*

A Wildtyp von *S. coelicolor*. **B-D** Auswirkung verschiedener Mutationen auf unterschiedliche *bld*-Gene (**B**: *bldA39*; **C**: *bldA43*; **D**: *bldC18*). Die Kolonien bilden kein Luftmyzel, die Oberfläche ist glatt und zum Teil schleimig. Die Markierung entspricht 0,25 cm. Entnommen und bearbeitet nach Merrick, 1976.

Die Familie der *whi*-Gene (englisch *white* = weiß) reguliert die Sporenproduktion. Fehlen diese Gene, kann zwar das Luftmyzel gebildet werden, es werden jedoch keine Sporen ausdifferenziert. Das Zellgeflecht erscheint weiß, da es aufgrund des fehlenden Sporenpigments zu keiner Graufärbung der Oberfläche mehr kommt (Abb. 2.5). Die *whi*-Gene sind überdies für eine synchrone Zellteilung verantwortlich. Dieser Vorgang ist für die Bildung monogenomischer Sporen essentiell. (Chater, 1972; McVittie, 1974)

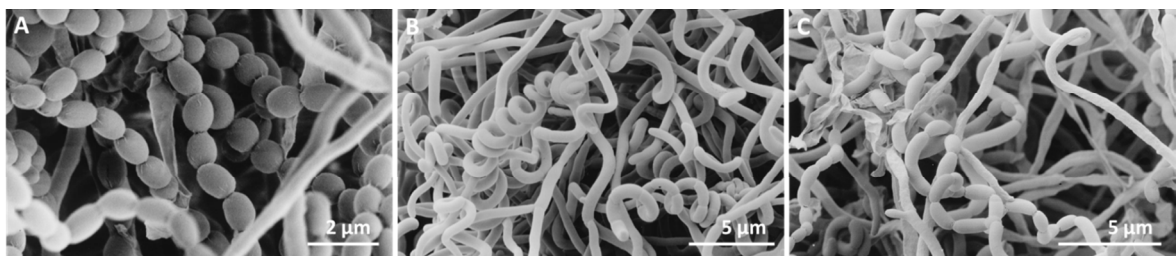


Abbildung 2.5: Einfluss der *whi*-Gene auf die Wuchsform von *S. coelicolor*

A Wildtyp von *S. coelicolor*. **B-C** Effekt einer Mutation in *whiK* (**B**) und *whiL* (**C**) auf den Wuchs von *S. coelicolor*. Das Luftmyzel bildet sich, kann aber nicht zu Sporen maturieren. Entnommen und bearbeitet nach Ryding *et al.*, 1999.

2.1.2.2 Sekundärmetabolite

In der Differenzierungsphase des Lebenszyklus wird nicht nur das aus dem Substrat aufragende Luftmyzel gebildet, sie markiert gleichzeitig den Beginn der Produktion verschiedener Sekundärmetabolite. (Chakraborty & Bibb, 1997; Ochi, 1986)

Besonders bekannt ist die Gattung *Streptomyces* für die Vielzahl der von ihr produzierten Antibiotika. Etwa zwei Drittel aller bekannten natürlichen Antibiotika werden von Streptomyceten gebildet. (Bentley *et al.*, 2002; Watve *et al.*, 2001) Beispiele hierfür sind Chloramphenicol (*S. venezuelae*), Tetracyclin (*S. aureofaciens*) und Phosphomycin (*S. fradiae*), um nur einige der bekannteren Antibiotika zu nennen. (Procopio *et al.*, 2012) Neben Antibiotika werden auch

andere Arten bioaktiver Substanzen von ihnen gebildet. Über 7600 von Streptomyceten produzierte Metabolite sind bereits bekannt. (Bérdy, 2005) Streptomyceten produzieren zusätzlich zu antibiotisch aktiven Substanzen außerdem Antimykotika und antivirale Metabolite, Tumorsuppressoren, Enzyminhibitoren und Immunmodulatoren sowie Insektizide, Pestizide und Herbizide. Des Weiteren produzieren sie regulatorische Metabolite wie Wachstumsfaktoren und Siderophore. (Demain, 1999; Demain & Sanchez, 2009; Tarkka & Hampf, 2008)

2.1.2.3 Biotechnologische Relevanz

Neben der Tatsache, dass Streptomyceten aufgrund der Fülle der von ihnen produzierten Sekundärmetabolite für die Biotechnologie und Biopharmazie besonders interessant sind, sind sie auch für die Produktion bioaktiver Substanzen von großer Bedeutung. Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* ist zwar einer der meist genutzten Produktionsorganismen, doch eignet es sich nicht für die Produktion aller Substanzen. *E. coli* kann bestimmte posttranslationale Modifikationen nicht einführen (z.B. Glycosylierungen). Zudem werden die Produkte zum Teil nur in sehr geringen Mengen exprimiert oder die aktive Faltung des Proteins wird nicht erreicht. Streptomyceten (hier besonders *S. lividans*) mit der Möglichkeit, diese Art in Fermentern zu kultivieren, eignen sich gut für die rekombinante Proteinproduktion. Zudem sind Streptomyceten in der Lage vielfältige Proteinmodifikationen einzuführen. Überdies können sie Proteine in großen Mengen sekretieren und nicht nur intrazellulär akkumulieren. Die Extraktion der biotechnologisch relevanten Proteine wird so erleichtert. (Anne *et al.*, 2012; Baneyx, 1999)

2.2 *Streptomyces coelicolor*

2.2.1 Sekundärmetabolite *S. coelicolor*

Das als Modellorganismus für Actinomyceten geltende Bakterium *S. coelicolor* produziert die fünf Antibiotika Actinorhodin (Abb. 2.6 A), Undecylprodigiosin (Abb. 2.6 B), CDA (calcium dependent antibiotic), Methylenomycin A und abCPK (abCPK = Antibiotikum des cpk-Genclusters). Die Antibiotika werden in variierenden Mengen gebildet. Actinorhodin und Undecylprodigiosin werden in größerer Quantität als die übrigen drei Antibiotika produziert.

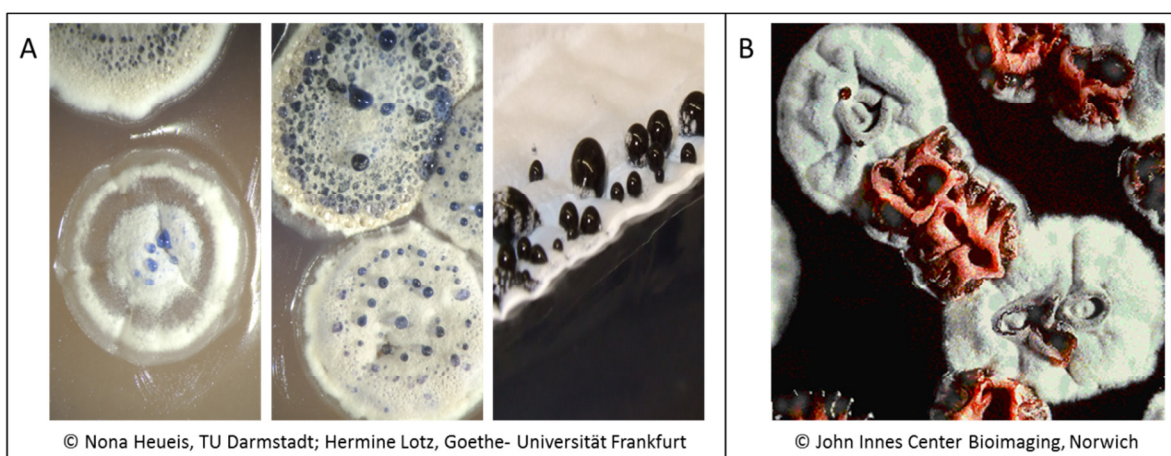


Abbildung 2.6: Antibiotikaproduktion von *S. coelicolor*

A Die drei Ausschnitte zeigen die Produktion von Actinorhodin auf Kolonien von *S. coelicolor*. Die Kolonien wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (v.l.n.r. 3 d, 6 d, 10 d). **B** Undecylprodigiosin auf Kolonien von *S. coelicolor*. Quellen sind im Bild aufgeführt.

Actinorhodin ist ein Polyketidantibiotikum und funktioniert auch als pH-Indikator. Bei saurem pH zeigt es eine rote, in alkalischem Milieu eine blaue Färbung. Die Gene der Actinorhodin-Biosynthese sind in einem Operon organisiert und werden zusammen exprimiert. (Rudd & Hopwood, 1980) Es wird meist in der Stationärphase des Lebenszyklus gebildet, bei verändertem Nährstoffangebot kann es aber auch wuchsphasenunabhängig produziert werden. (Coisne *et al.*, 1999) Actinorhodin selbst wird nicht therapeutisch eingesetzt, das Gencluster konnte in anderen Streptomycceten aber dafür verwendet werden, neue Antibiotika zu identifizieren. (Demain, 1988) Die Gene der Actinorhodin-Synthese wurden hierzu plasmidständig in andere Streptomycceten-Arten transformiert. *S. sp.* AM-7161, der Produzent von Medermycin, konnte nach der Transformation nicht nur Actinorhodin und Medermycin produzieren. Er produzierte zusätzlich große Mengen der neu entdeckten Substanzen Mederrhodin A und B. (Hopwood *et al.*, 1985)

Auch die Synthesegene von Undecylprodigiosin sind in einem Operon organisiert. Es wird als rote Substanz ausgeschieden, weshalb es oft als *red* (engl. rot) bezeichnet wird. Anders als Actinorhodin wird es therapeutisch als Antitumorigen und Immunsuppressivum verwendet. (Montaner & Pérez-Tomás, 2003; Mortellaro *et al.*, 1999; Rudd & Hopwood, 1980)

Methylenomycin A ist als einziges der fünf von *S. coelicolor* produzierten Antibiotika zusammen mit seinen Resistenzgenen auf dem Plasmid SCP1 kodiert. Der für diese Arbeit verwendete Stamm *S. coelicolor* M145 besitzt jedoch keines der beiden Plasmide aus *S. coelicolor* A3(2), SCP1 oder SCP2 und produziert dieses Antibiotikum somit nicht. Die antibiotische Wirkung von Methylenomycin A richtet sich gegen Gram-positive wie Gram-negative Bakterien, im Besonderen gegen *Proteus vulgaris* und *Proteus morganii*. (Bibb, 1996; Haneishi *et al.*, 1974; Hobbs *et al.*, 1992)

Das Antibiotikum CDA, benannt nach seiner Eigenschaft nur in Gegenwart von Calciumionen aktiv zu sein, ist wirksam gegen eine Vielzahl Gram-positiver Bakterien. Es bildet Kanäle in planaren Lipiddoppelschichten und macht sie so für monovalente Kationen permeabel. (Lakey *et al.*, 1983)

Die fünfte antibiotisch aktive Substanz abCPK wurde 2010 im noch nicht charakterisierten Gencluster der Typ I Polyketid-Synthase gefunden. Das Gencluster wurde bei der Sequenzierung des Genoms von *S. coelicolor* neben zwölf weiteren noch nicht charakterisierten Genclustern identifiziert, denen noch keine Metabolite zugeordnet werden konnten. Die bioaktive Substanz wird bislang nicht therapeutisch verwendet. (Gottelt *et al.*, 2010)

2.2.2 Das Genom von *S. coelicolor*

Das 8.7 Mbp große Genom des Bakteriums *S. coelicolor* wurde im Jahr 2002 vollständig sequenziert. Es wurden fast 8000 Gene annotiert, viele dieser Annotationen sind jedoch immer noch vorläufig. (Bentley *et al.*, 2002)

Der Gehalt an GC-Basen liegt bei etwa 70%. Eine Besonderheit des Genoms von *S. coelicolor* besteht in seiner linearen Form, welches von Proteinen der freien 5'-Enden in einem pseudozirkulären Zustand gehalten wird. Ein zentraler Replikationsursprung (*origin of replication*, *oriC*) repliziert das Genom bidirektional. Die essentiellen Funktionen des Organismus, die sogenannten *housekeeping*-Gene, werden in der Kernregion um den Mittelpunkt kodiert (Abb. 2.7, äußerster Ring in dunkelblau), während Gene von Sekundärmetaboliten, Exoenzymen und Gene verschiedener Stressantworten in den beiden distalen Arm-Regionen (Abb. 2.7, äußerster Ring in hellblau) kodiert werden. Auch massive Deletionen in den Arm-Regionen

schränken die Lebensfähigkeit von *S. coelicolor* nicht ein und unterstreichen die räumliche Trennung von essentiellen und weniger wichtigen Genen zwischen Kern-Region und Kodierung im Arm-Bereich des Genoms. (Hopwood, 2006; Volff & Altenbuchner, 1998)

Fast 1000 Proteinen wurde in der Vorhersage eine regulatorische Funktion zugeordnet. Diese hohe Anzahl entspricht dem komplexen morphologischen Lebenszyklus, dessen Abfolge reguliert werden muss. Gleichzeitig muss zudem die Produktion der Sekundärmetabolite koordiniert werden. Auch die hohe Anzahl an 65 identifizierten Sigmafaktoren entspricht der Notwendigkeit einer fein abgestimmten Regulation dieser komplexen Vorgänge. (Bentley *et al.*, 2002)

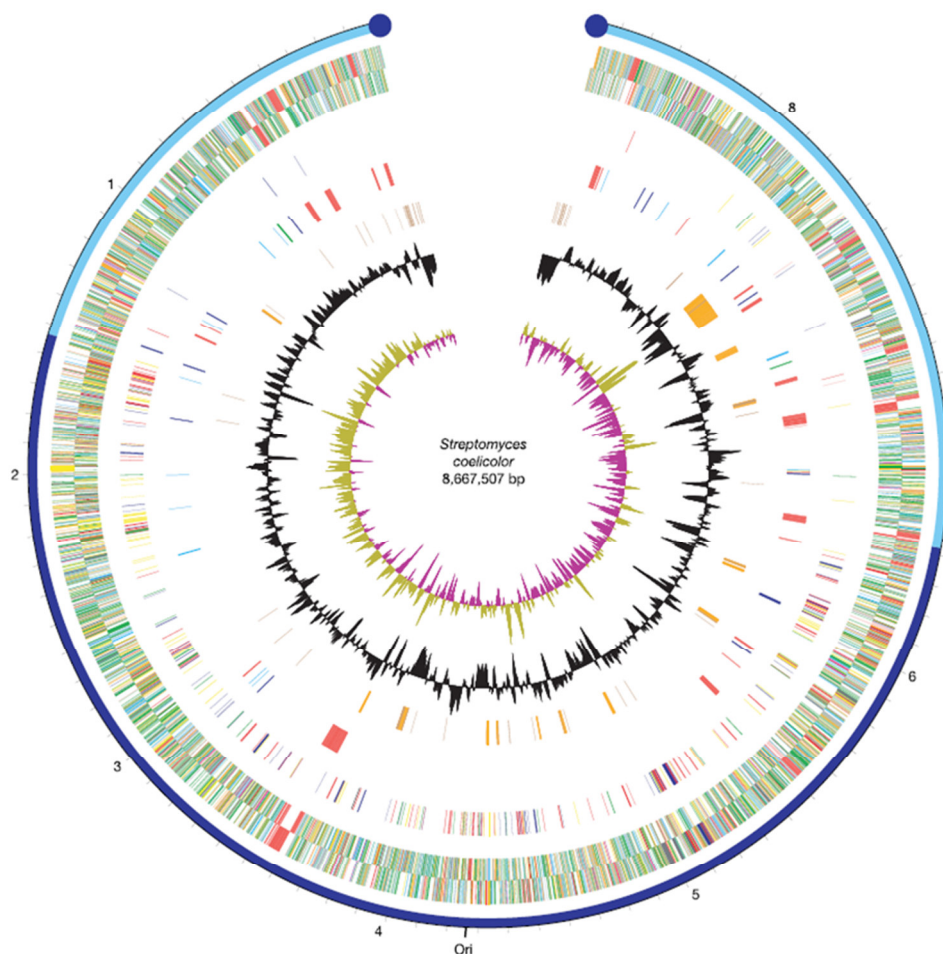


Abbildung 2.7: Schema des pseudozirkulären Chromosoms von *S. coelicolor* M145

Der äußere Ring markiert das Kern-Genom in dunkelblau, die distalen Arme in hellblau. Die Größe ist in 1 Mbp- Schritten verzeichnet. Die blauen Kreise am 3'- und 5'-Ende des Genoms stellen die Proteine dar, welche die Pseudozirkularisierung hervorrufen. Der zweite Doppelring (von außen) stellt alle annotierten Gene auf beiden chromosomalen Strängen dar. Die Farben der annotierten Gene bezeichnen deren Funktion, nachzulesen in Bentley *et al.* 2002. Der dritte Ring bezeichnet die essentiellen Gene der Kern-Region, während der vierte Ring die Annotationen der distalen Arm-Regionen verzeichnet. Der fünfte, orange Kreis der Abbildung zeigt mobile Elemente wie Transposons auf. Der schwarze Ring stellt den GC-Gehalt des Chromosoms dar, während der siebte und innerste Kreis die GC-Verteilung (G-C/G+C) verkörpert: (gelb: >1, lila: <1). Entnommen und bearbeitet nach Bentley *et al.*, 2002.

2.3 Regulation der Genexpression

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, ist das Genom von *S. coelicolor* in eine Kern-Region mit essentiellen, so genannten *housekeeping*-Genen und zwei Arm-Regionen mit weniger relevanten Funktionen unterteilt. Die *housekeeping*-Gene werden vorrangig exprimiert und stellen das Überleben des Organismus sicher, indem Wachstum und Differenzierung aufrechterhalten werden. Die Funktionen der Gene aus den Arm-Regionen, wie Sekundärmetabolit-Produktion und Exoenzym-Sekretion, sind für die Reaktion auf Umwelteinflüsse und Stresssituationen verantwortlich. Die Regulation dieser Prozesse kann auf verschiedenen Ebenen der Genexpression erfolgen.

Transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren sind Proteine, die DNA-Motive binden und die Promotoraktivität aktivieren oder reprimieren können. (Pabo & Sauer, 1992)

Andere Regulatoren können auch an die RNA-Polymerase oder Proteine der Transkriptionsmaschinerie binden und so Einfluss auf deren Aktivität nehmen. In Prokaryoten sind dies Sigmafaktoren. Sie binden die RNA-Polymerase und modulieren deren Struktur. Das Holoenzym aus Sigmafaktor und RNA-Polymerase kann die Promotorregion besser binden und die Transkription initiieren. Das Genom von *S. coelicolor* wird von Sigmafaktoren in Bereiche geteilt, deren Gene eine zusammenhängende Funktion ausüben. Der Regulationsmechanismus gewinnt durch diese Gruppierung an Effizienz, da die Regulation eines einzelnen Gens (des Sigmafaktors) die Regulation aller von ihm abhängigen Gene nach sich zieht. *S. coelicolor* besitzt 65 Sigmafaktoren, während in *E. coli* nur 7 Sigmafaktoren bekannt sind. Bezieht man die Anzahl der Sigmafaktoren auf die Genomgröße, so besitzt *S. coelicolor* bei einem „nur“ etwa doppelt so großen Genom, verglichen mit *E. coli*, die 10fache Menge dieser Regulationsproteine. Die Notwendigkeit einer fein abgestimmten Regulation der komplexen Abfolge des Lebenszyklus und der Produktion der Sekundärmetabolite wird auch hier deutlich. (Bentley *et al.*, 2002; Blattner *et al.*, 1997) Die Familie der Sigmafaktoren σ^{70} ist besonders verbreitet. Diese Sigmafaktoren regulieren eine Vielzahl von Stressantworten, besonders Hitzestress. In *E. coli* wird mit σ^{32} und σ^E auf die Missfaltung von Proteinen reagiert. In *Bacillus subtilis* reagiert σ^M auf osmotischen Stress. Die Biosynthese der Flagellen in *Salmonella typhimurium* wird ebenfalls über einen Sigmafaktor (σ^F) gesteuert. Auch in *S. coelicolor* gibt es Sigmafaktoren, die zur σ^{70} -Familie gehören. σ^R gehört zur Stressantwort bei oxidativem Stress und σ^E ist Teil der Signalkaskade, die Veränderungen der Zellhülle sensiert. Streptomyceten-spezifische Sigmafaktoren wie σ^{BldN} oder σ^{WhiG} sind an der Ausbildung des Luftmyzels bzw. der Sporenmaturation beteiligt. (Paget *et al.*, 1998; Romero-Rodriguez *et al.*, 2015)

Der Mechanismus der Attenuation konnte sich bei Prokaryoten etablieren, da hier Transkription und Translation anders als bei Eukaryoten nicht räumlich getrennt sind. Zur Beschreibung des Vorgangs soll das bekannte Tryptophan-Operon (*trp*-Operon) dienen. Während die mRNA noch von der RNA-Polymerase transkribiert wird, translatiert das Ribosom bereits die naszierende mRNA in ihre Aminosäuresequenz. Wenn Tryptophan in der Zelle zur Verfügung steht und so auch mit Tryptophan beladene tRNAs, kann das Ribosom am Trp-Codon die Aminosäure direkt einbauen und die mRNA bis zum Terminator weiter translatieren, wo die Translation dann abgebrochen wird (Abb. 2.8 links). Wenn kein Tryptophan in der Zelle vorliegt, wird die Translation am Trp-Codon aufgehalten. Die mRNA kann nun einen Antiterminator ausbilden, der die ursprüngliche Terminatorstruktur auflöst. Die RNA-Polymerase kann die restlichen Gene des *trp*-Operons zur Synthese von Tryptophan transkribieren (Abb. 2.8 rechts). (Henkin & Yanofsky,

2002) Auch in Streptomyceten wurden Attenuationsmechanismen gefunden. In *S. coelicolor* wird der Genlocus der *trpEG*-Gene, welcher für die ersten Proteine der Tryptophan-Synthesewege kodiert, durch Attenuation reguliert. (Hu *et al.*, 1999) In *S. fradiae* wird das Tylosin-Resistenzgen *tlrA* gegen das selbst vom Organismus hergestellte Antibiotikum Tylosin durch Attenuation reguliert. (Kelemen *et al.*, 1994)

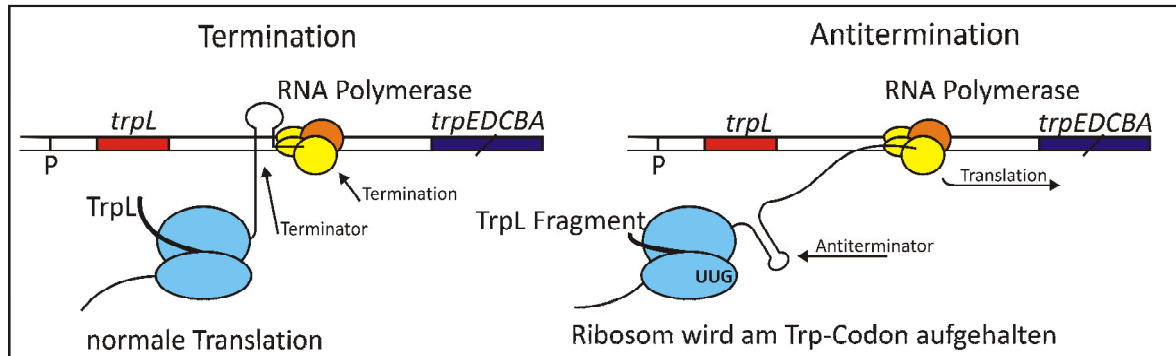


Abbildung 2.8: Attenuation des *trp*-Operons

Links Bei der Termination kann das Ribosom die Trp-Codons in normaler Geschwindigkeit überlesen, da Trp-tRNAs zur Verfügung stehen. **Rechts** Bei Trp-Mangel wird das Ribosom an diesen Codons aufgehalten, der Antiterminator in der mRNA kann sich ausbilden und die Gene des folgenden *trp*-Operons werden ebenfalls transkribiert und translatiert. Entnommen und bearbeitet nach Henkin & Yanofsky, 2002.

Eine weitere Kontrollebene ist die Modulation der Halbwertszeit einer mRNA. Diese kann durch die Expression spezifischer RNasen oder die Bindung von Proteinen verändert werden. (Belasco & Higgins, 1988)

Eine weitere Möglichkeit der Regulation besteht in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Einzelne Aminosäuren können acetyliert, glycosyliert, methyliert und phosphoryliert werden, um nur einige Modifikationsmöglichkeiten zu nennen. Aminosäuren können auch komplett ausgetauscht werden. Die Proteinaktivität wird so verändert. Die Bindung von Kofaktoren oder regulatorischen RNAs kann die Proteinfunktion aktivieren oder inhibieren, ebenso wie die Multimerisierung eines Proteins. In Actinobakterien können Proteine durch die Bindung eines prokaryotischen Ubiquitin-ähnlichen Proteins für die Degradation markiert werden. (Burns & Darwin, 2010; Hesketh *et al.*, 2002; Mann & Jensen, 2003; Nothaft & Szymanski, 2010)

2.3.1 Genregulation durch nicht-kodierende RNAs

Zu den bekanntesten RNA-Molekülen zählen ribosomale RNAs (rRNAs), transfer RNAs (tRNAs) und die RNA-Komponenten des eukaryotischen Spliceosoms, die *small nuclear* RNAs (snRNAs). Diese RNAs sind Teile der Zellmaschinerie und liegen, um ihre Funktion auszuführen, in Komplexen mit Proteinen vor. (Eddy, 1999)

In den letzten Jahrzehnten jedoch wurden in allen Domänen des Lebens mehr und mehr RNA-Moleküle gefunden, die regulatorische Fähigkeiten haben. In allen untersuchten Organismen nimmt das Potential dieser regulatorischen RNAs stetig zu. Im Folgenden werden deshalb erst nicht-kodierende RNAs in Archaeen und Eukaryoten kurz beschrieben, während dann auf bakterielle regulatorische RNAs eingegangen wird, auf denen der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt.

In Archaeen konnten durch RNA-Sequenziermethoden und bioinformatisches Vorgehen regulatorische RNAs in allen bislang untersuchten Arten identifiziert werden. Ihre Größe kann zwischen 50 nt bis etwa 500 nt variieren. Dies spiegelt auch ihre große regulatorische Vielfalt wider. Sie sind beteiligt an der Regulation des Stoffwechsels, der morphologischen Ausdifferenzierung, Stressantworten und der für viele Archaeen typischen Adaption an Extremhabitate. sRNAs aus Archaeen sind in der Lage, sowohl im 5′-, als auch im 3′-UTR ihrer Ziel-mRNAs zu binden. Auch snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), die eigentlich im (bei Archaeen nicht existenten) Nukleus vorkommen, wurden identifiziert. Aufgrund der konservierten Funktion wurde die Bezeichnung beibehalten. (Babski *et al.*, 2014)

In Eukaryoten wurden regulatorische RNAs in großer Anzahl identifiziert. MicroRNAs (miRNAs), *short interfering RNAs* (siRNAs), lncRNAs (*long, non-coding RNAs*), snoRNAs und piwi-associated RNAs (piRNAs) beeinflussen die Genregulation in verschiedenen Zelltypen bei den unterschiedlichsten Prozessen wie Chromosomensegregation, RNA-Stabilität, RNA-Prozessierung und vielen weiteren Vorgängen. MiRNAs sind etwa 20-24 bp lange RNA-Moleküle, die nach mehreren Prozessierungsschritten als einzelsträngige RNA vorliegen und im 3′-UTR der zu regulierenden Ziel-mRNA binden. (Carthew & Sontheimer, 2009) Für diese Bindung wird eine sogenannte *seed*-Region verwendet, die auch bei der Bindung weiterer Ziel-mRNAs die Interaktion vermittelt. Eine miRNA kann mehrere Ziel-mRNAs ansprechen, während ein Gen auch von mehreren verschiedenen miRNAs reguliert werden kann. (Thomson *et al.*, 2011) Da miRNAs auch an elementaren Regulationen in höheren Eukaryoten beteiligt sind, besteht oft eine direkte Verbindung zu Erkrankungen wie z.B. der Tumorgenese. Es wird davon ausgegangen, dass im humanen Genom etwa die Hälfte aller mRNAs von miRNAs reguliert wird. (Friedman *et al.*, 2009; Racz *et al.*, 2011)

In Bakterien wurde die erste regulatorische, nicht-kodierende RNA (*small non-coding RNA*, sRNA) 1967 von Hindley *et al.* beschrieben und 1971 von Brownlee *et al.* als „6S RNA“ näher klassifiziert. Ihre Funktion, die Regulation der Transkription durch Interaktion mit der RNA-Polymerase, konnte jedoch erst viele Jahre später, von Trotochaud *et al.* im Jahr 2005, geklärt werden. (Brownlee, 1971; Hindley, 1967; Trotochaud & Wassarman, 2005; Wassarman & Storz, 2000) Weitere sRNAs in *E. coli* wurden in früherer Zeit häufig als Zufallsbefund in Versuchen mit komplett anderer Zielsetzung gefunden. Als ihre Bedeutung offensichtlich wurde, begann man gezielt danach zu suchen. (Gojobori & Nei, 1981) In *E. coli* konnten daraufhin etwa 80 sRNAs verifiziert werden. (Argaman *et al.*, 2001; Waters & Storz, 2009)

Eine der ersten in *E. coli* näher untersuchten sRNAs wurde 1984 von Mizuno *et al.* entdeckt. Damals war die Nomenklatur der nicht-kodierenden RNAs noch nicht einheitlich, weshalb die sRNA als micRNA (*mRNA-interfering complementary RNA*) bezeichnet wurde, woraus sich die Bezeichnung MicF für diese sRNA ableitete. Die 174 nt lange sRNA wird direkt *upstream*, aber gegenläufig des *ompC*-Gens kodiert. Sie bindet die mRNA *ompF* und verhindert deren Translation. Dies beeinflusst die Osmoregulation des Organismus, welche über die Homöostase der Porenproteine OmpF und OmpC abgestimmt wird. (Mizuno *et al.*, 1984)

Die Vielzahl regulatorischer sRNAs wurde in zwei Klassen eingeteilt. Die *cis*- und *trans*-kodierten RNAs. Bei *cis*-kodierten RNAs ist der Regulator auf der mRNA kodiert, welche er kodiert, und wird Riboswitch genannt. Die Fähigkeit von RNA, verschiedene Sekundärstrukturen auszubilden, steht im Mittelpunkt dieses Regulationsmechanismus. Die *trans*-kodierten, bakteriellen RNAs können nochmals in zwei Klassen unterteilt werden. *Antisense RNAs* (asRNAs) werden in *cis* auf dem

gegenläufigen Strang ihres Ziel-Gens kodiert. Dies bedingt das besondere Merkmal der perfekten Komplementarität mit ihrer Ziel-mRNA. Die zuvor beschriebenen sRNAs gehören zur Kategorie der *trans*-kodierten RNAs, die ganz unabhängig von ihren Ziel-mRNAs (sie können potentiell mehrere mRNAs regulieren) in intergenen Regionen des Genoms lokalisiert sind.

2.3.1.1 Genregulation durch *cis*-kodierte regulatorische RNAs

2.3.1.1.1 Genregulation durch *cis*-kodierte regulatorische RNAs – Riboswitch

Riboswitche gehören zu den *cis*-kodierten regulatorischen RNAs. Sie werden im 5'-UTR der mRNA kodiert, welche von ihnen reguliert wird. Sie bestehen aus einer Aptamer-Domäne, einem strukturierten Bereich in der RNA, die einen Liganden binden kann, und der Expressionsplattform. Die Ligandenbindung des Aptamers verursacht eine Konformationsänderung in der Expressionsplattform, deren Struktur dann entweder die Transkription oder die Translation zulässt bzw. inhibiert. Riboswitche regulieren anders als sRNAs keine Stressantworten, sondern sind häufig in der Regulation metabolischer Operons zu finden. Die von Riboswitchen regulierten Gene sind an der Synthese oder dem Abbau bzw. dem Transport oder der Aufnahme des Liganden beteiligt, der den Riboswitch bindet. Die Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Liganden ist hierbei hochaffin. (Kim & Breaker, 2008)

Auf transkriptioneller Ebene kann die Ligandenbindung des Riboswitches Konformationsänderungen bewirken, die eine bestehende Terminatorstruktur auflösen und die Transkription zulassen können. Die Bindung des Liganden löst Strukturveränderungen aus, die den Antiterminator in einen Terminator umfalten und die Transkription hemmen (Abb. 2.9 links). Auf translationaler Ebene initiieren Riboswitche Konformationsänderungen, die die Maskierung der Ribosomenbindestelle (RBS) und des Startcodons auflösen, weshalb das Ribosom binden und die mRNA translatieren kann. Bei einer Sequestrierung wird die mRNA durch die Bindung eines Liganden in eine, die RBS abdeckende, Stammschleife umgefaltet (Abb. 2.9 rechts).

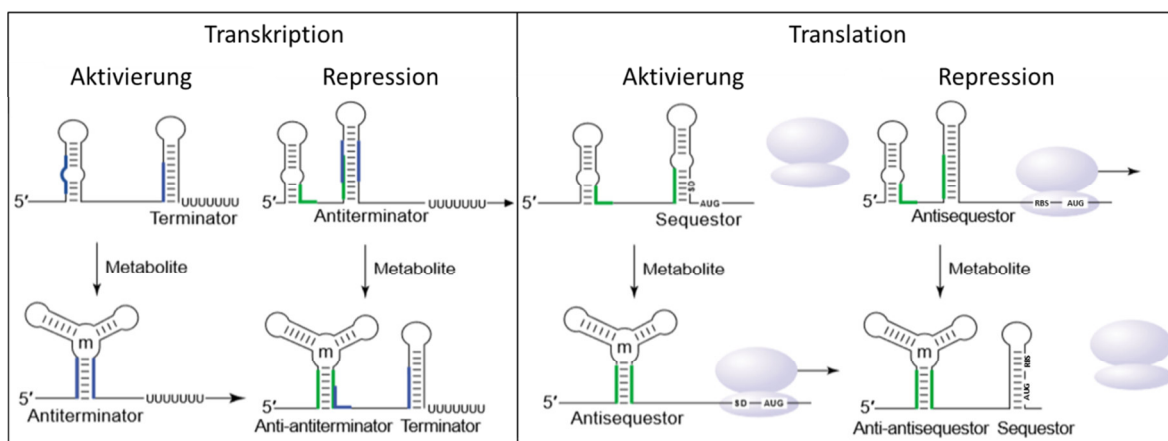


Abbildung 2.9: Funktionsmechanismen eines Riboswitches

Links Transkriptionelle Regulation eines Riboswitches. Bei einer Aktivierung initiiert die Ligandenbindung Konformationsänderungen, die den Terminator auflösen. Bei einer Repression führt die Bindung des Liganden die strukturelle Bildung einer Terminatorstruktur ein. **Rechts** Die translationale Regulation funktioniert nach dem gleichen Muster wie die transkriptionelle Regulation, nur dass hierbei die Bindung des Ribosoms an die RBS und das Startcodon ermöglicht oder reprimiert wird. Entnommen und bearbeitet nach Nudler & Mironov, 2004.

2.3.1.1.2 Genregulation durch *cis*-kodierte regulatorische RNAs – RNA-Thermometer

RNA-Thermometer gehören ebenfalls zur Klasse der *cis*-kodierten RNAs. Ähnlich wie bei Riboswitchen erfahren auch sie eine Konformationsänderung, die die RBS freigibt und die Translation ermöglicht. Während Riboswitches auf Metabolitkonzentrationen reagieren, sensieren RNA-Thermometer die Temperatur der Umgebung. Mittlerweile sind RNA-Thermometer bekannt, die auf Hitze und Kälte reagieren und somit auch Virulenzgene regulieren können. Die RNA-Strukturen befinden sich im 5'-UTR der mRNA und schmelzen bei hohen Temperaturen auf, sodass das Ribosom an die RBS binden kann (Abb. 2.10 links).

Ein weiteres RNA-Thermometer funktioniert über die Wechselwirkung der mRNA bei niedrigen Temperaturen mit einer sRNA, die die Struktur der mRNA zusätzlich binden muss, damit die RBS frei wird. Der 159 nt lange 5'-UTR der *cspA*-mRNA in *E. coli* wurde als Kälteschock-Thermometer klassifiziert (Abb. 2.10 rechts).

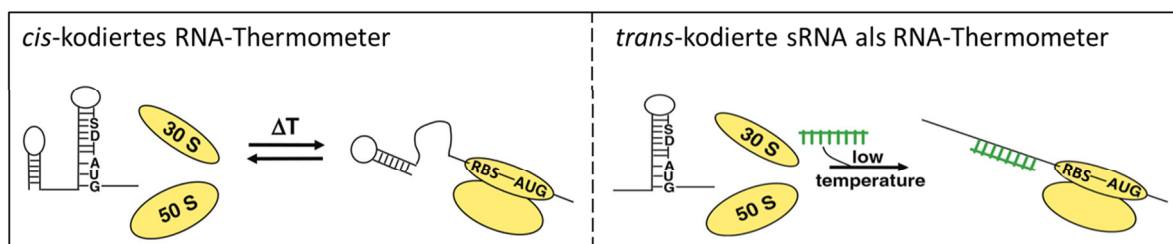


Abbildung 2.10: Mechanismus eines RNA-Thermometers

Links Das *cis*-kodierte RNA-Thermometer schmilzt unter Hitzeeinwirkung auf und gibt die vorher maskierte RBS frei. **Rechts** Bei niedrigen Temperaturen reicht die mRNA alleine nicht aus, um als Thermometer zu wirken. Die sRNA-Sequenz (grün) muss die mRNA zusätzlich binden, damit die RBS vollständig frei wird. Entnommen und bearbeitet nach Narberhaus *et al.*, 2006.

2.3.1.2 Genregulation durch *trans*-kodierte regulatorische RNAs

2.3.1.2.1 Genregulation durch *trans*-kodierte regulatorische RNAs - *antisense* RNAs

Regulatorische RNAs, die *cis*-kodiert sind, zeichnen sich durch eine perfekt komplementäre Bindung an ihre Ziel-mRNA aus. Sie sind gegenläufig auf dem Gegenstrang ihres Zielgens kodiert und binden somit nur diese eine Ziel-mRNA. *Antisense* RNAs (asRNAs) sind etwa 50-300 nt lang und nehmen eine hochstrukturierte Sekundärstruktur an. (Brantl, 2007)

Zunächst wurden asRNAs in Plasmiden, Phagen und Transposons identifiziert, später konnten sie jedoch auch in bakteriellen Chromosomen nachgewiesen werden. Sie greifen in die Regulation von transkriptioneller Attenuation, die Inhibierung der Translation und die Konjugationseffizienz sowie RNA-Degradation und -Spaltung ein. AsRNAs sind zumeist für die posttranskriptionelle Inhibierung ihrer Ziel-mRNA zuständig, zunehmend werden auch aktivierende Regulationsmechanismen aufgedeckt. (Brantl, 2007; Wagner *et al.*, 2002)

Ein Beispiel der *antisense*-Regulation ist die Plasmidreplikation. Diese wird über die Interaktion der asRNA Inc und ihrer Ziel-mRNA *repZ* kontrolliert. Wenn Inc an *repZ* bindet, faltet sich die mRNA in eine, die RBS maskierende, Schleife. Bindet die asRNA Inc nicht an die mRNA, liegt die RBS frei und die Translation des Replikationsinitiatorproteins RepZ kann stattfinden (Abb. 2.11 A).

Der mRNA-Abbau in der Killertoxinregulation von *B. subtilis* wird über die asRNA RatA reguliert. Bindet die asRNA ihre Ziel-mRNA *txpA*, wird diese als doppelsträngiges Substrat von RNase III erkannt und degradiert (Abb. 2.11 B).

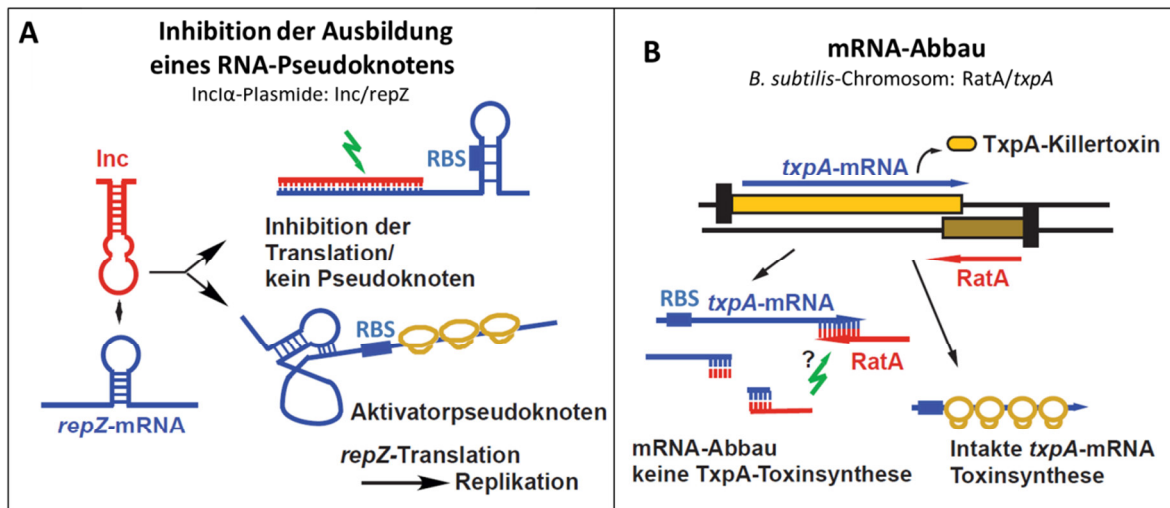


Abbildung 2.11: Wirkmechanismen von cis-kodierten asRNAs

A Plasmidreplikationskontrolle. Die RBS des Proteins RepZ ist bei der Bindung der asRNA Inc maskiert. Wenn die asRNA nicht bindet, kann sich ein Pseudoknoten falten, die RBS ist frei und die mRNA wird translatiert. **B** Killertoxinregulation in *B. subtilis*. Die asRNA RatA bindet ihre Ziel-mRNA txpA am 3'-Ende und markiert diese für den Abbau durch RNase III, da der mRNA-sRNA-Komplex doppelsträngiges Substrat für die Ribonuklease bildet. Entnommen und bearbeitet nach Brantl, 2008.

2.3.1.2.2 Genregulation durch trans-kodierte regulatorische RNAs – sRNAs

sRNAs (small non-coding RNAs) sind in intergenen Regionen unabhängig von ihrer Ziel-mRNA in trans kodiert. Diese binden sie über eine imperfekte Basenpaarung, was ihnen die Bindung mehrerer Ziel-mRNAs ermöglicht. sRNAs sind etwa 70 bis 200 nt lang, ihre Termination erfolgt meist Rho-unabhängig. Die Sequenz der sRNAs bedingt eine hochstrukturierte Faltung, die zudem ihre Stabilität erhöht und Einfluss auf die regulatorische Fähigkeit hat. (Gottesman, 2005; Vogel & Sharma, 2005)

Die Interaktion einer sRNA mit ihrer Ziel-mRNA kann über unterschiedliche strukturelle Elemente, wie *loop*-Regionen oder einzelsträngige Bereiche, zustande kommen. Dies ermöglicht die Bindung mehrerer Ziel-mRNAs durch eine sRNA (Abb. 2.12 A). Die Verwendung mehrerer Sequenz-Bereiche innerhalb einer sRNA zur Interaktion mit ihrer Ziel-mRNA ist ebenfalls möglich (Abb. 2.12 B). Nicht immer vermitteln *loop*-Regionen die Bindung zwischen der mRNA und ihrem Regulator. Auch einzelsträngige Bereiche der sRNA-Sequenz können mit der Ziel-mRNA interagieren (Abb. 2.12 C).

Die Funktionen der bislang untersuchten sRNAs sind vielfältig. Sie sind an der Strukturbildung der Zellmembran und ihrer Oberfläche beteiligt (MicF/*ompF* in *E. coli*; (Mizuno *et al.*, 1984)) und sie nehmen Einfluss auf die Prozesse der Motilität und Biofilm-Bildung (OmrA, OmrB/*csgD* in *E. coli*; (Mika & Hengge, 2013)). sRNAs können an der Regulation von Transportern mitwirken (GcvB/*phpP* in *E. coli*; (Coornaert *et al.*, 2013)) und verschiedenste Stoffwechselwege beeinflussen (Spot42/*galK* in *E. coli*; (Møller *et al.*, 2002)). Das Toxin/Antitoxin-System eines Bakteriums kann ebenfalls reguliert werden (TarB/VspR in *Vibrio cholerae*; (Davies *et al.*, 2012)), um an dieser Stelle nur einige Möglichkeiten zu nennen.

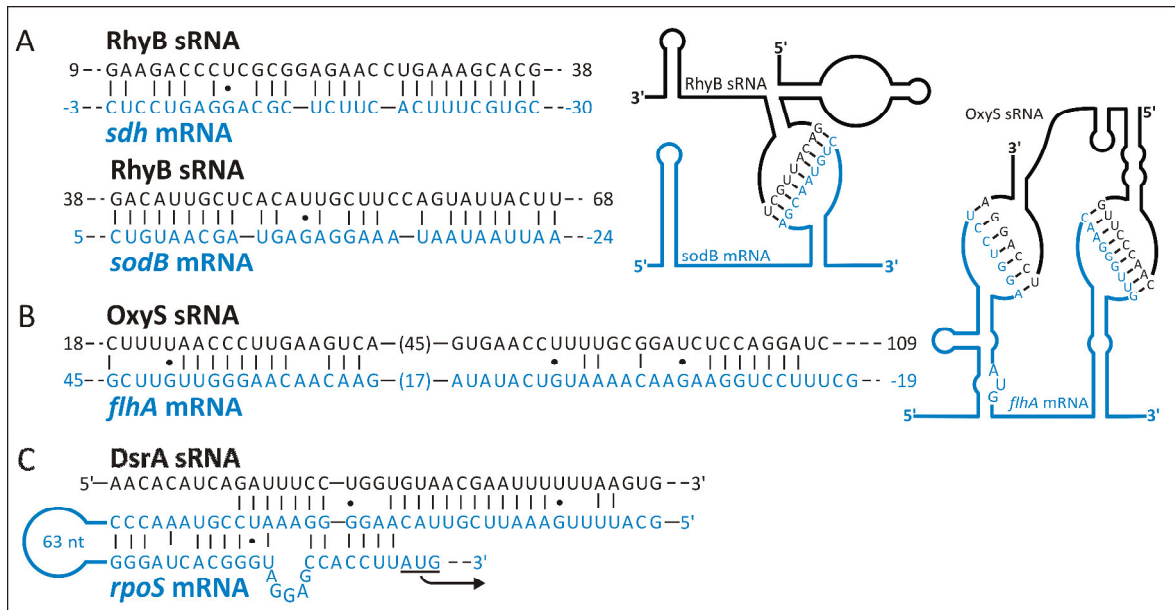


Abbildung 2.12: sRNA-mRNA-Interaktionen

Interaktionen der sRNAs RhyB, OxyS und DsrA mit ihren Ziel-mRNAs. **A** RyhB bindet die mRNAs *sdh* und *sodB*. Eine *loop*-Region vermittelt die Interaktion. **B** Bindung der sRNA OxyS an die Ziel-mRNA *flhA*. Die sRNA interagiert über zwei *loop*-Regionen mit der mRNA, 45 nt dazwischen bleiben ungepaart. **C** DsrA bindet seine Ziel-mRNA *rpoS* mit einer imperfekten Bindung, sodass nur das Startcodon ungepaart vorliegt. Entnommen und bearbeitet nach Gottesman, 2005; Vogel & Sharma, 2005.

Die Mechanismen, mit denen diese Regulationen erreicht werden, sind ebenso vielfältig wie die regulierten Prozesse selbst. Bakterielle sRNAs können die RBS maskieren oder diese durch die Induktion von strukturellen Änderungen der mRNA freigeben. Hierbei binden sie die mRNA direkt über den regulatorischen Sequenzen oder überlappen diese (Abb. 2.13 A). Auch die RBS (MicF/*ompF* in *E. coli*; (Coleman *et al.*, 1984)) oder das Startcodon können durch die bindende sRNA überdeckt (DapZ/*oppA* in *Salmonella typhimurium*; (Chao *et al.*, 2012)) bzw. demaskiert werden. Für eine umfangreichere Übersicht verweise ich auf die exzellent zusammengetragene Beschreibung von Wagner & Romby 2015. (Wagner & Romby, 2015)

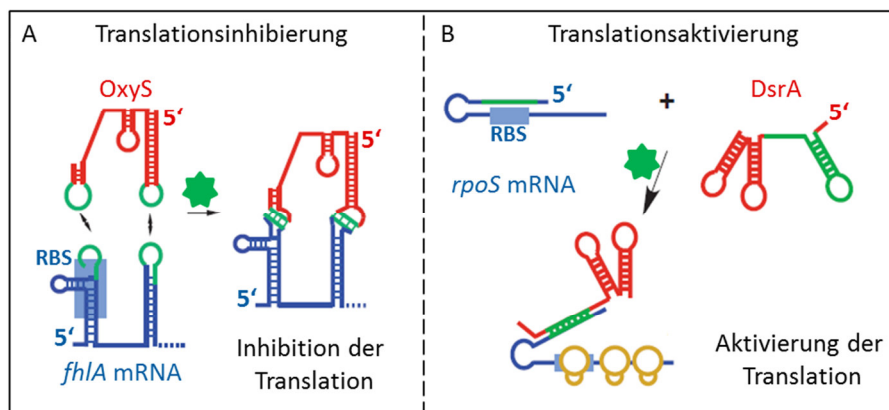


Abbildung 2.13: Mechanismen der Translationsaktivierung und -inhibierung durch sRNAs

Links Bei der Translationsinhibierung wird die RBS auf der mRNA entweder direkt von der sRNA gebunden oder die durch Bindung der mRNA entstehenden Konformationsänderungen maskieren diese. **Rechts** Bei der Aktivierung bindet die sRNA ihre Ziel-mRNA, die daraufhin strukturelle Umlagerungen erfährt. Die RBS wird so freigelegt und das Ribosom kann sich anlagern. Das bindungsvermittelnde Protein Hfq ist als grüner Stern dargestellt. Siehe auch Kapitel 2.3.1.3. Entnommen und bearbeitet nach Brantl, 2008.

Die mRNA kann jedoch auch in einem anderen Sequenzbereich gebunden werden und die daraus entstehenden Konformationsänderungen der mRNA-Struktur überdecken somit die regulatorischen Bindestellen. Dies kann auch in entgegengesetzter Weise ablaufen. Die sRNA bindet die mRNA, initiiert eine strukturelle Verschiebung und die für den Translationsstart nötigen Sequenzen sind frei. (Abb. 2.13 B)

2.3.1.2.2.1 Genregulation durch sRNAs – Translationsinhibition

Die Repression der Translation ist die hauptsächlich durch sRNAs ausgeführte Regulation. Folgend werden einige Beispiele der Translationsinhibition durch sRNAs aufgelistet. In den meisten Fällen wird die Inhibierung durch Maskierung der RBS und des Startcodons erreicht.

Wenn die Zelle osmotischem Stress ausgesetzt ist, reprimiert die regulatorische RNA MicF ihre Ziel-mRNA *ompF*. Die RBS und das Startcodon werden hierbei maskiert. MicF war eine der ersten sRNAs, die in *E. coli* identifiziert wurde (Abb. 2.14). (Guillier *et al.*, 2006) Die Interaktion der beiden RNAs wurde 1995 von Schmidt *et al.* aufgeklärt. (Schmidt *et al.*, 1995)

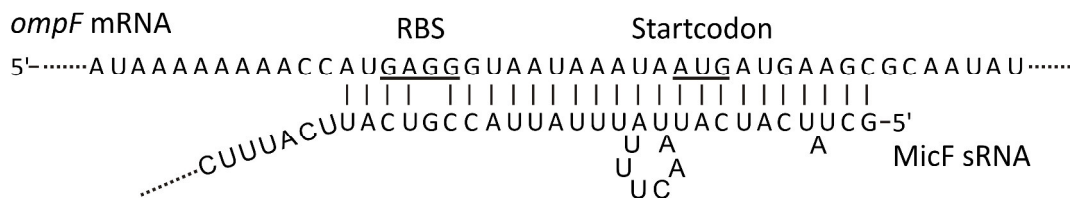


Abbildung 2.14: Interaktion der sRNA MicF mit der Ziel-mRNA *ompF*

Die imperfekte Bindung der sRNA MicF an die Ziel-mRNA *ompF* überdeckt sowohl die RBS als auch das Startcodon. Beide Sequenzen sind in der Abbildung hervorgehoben. Entnommen und bearbeitet nach Guillier *et al.*, 2006.

Eine weitere Translationsinhibition wird durch die sRNA OxyS vermittelt. Sie reguliert mehr als 40 Gene posttranskriptional. (Altuvia *et al.*, 1997) Als Beispiel einer solchen Regulation soll hier die Repression der mRNA des Sigmafaktors RpoS bei oxidativem Stress dienen (Abb. 2.15 A). (Zhang *et al.*, 1998) OxyS nutzt zur Regulation den vermittelnden Proteinfaktor Hfq, indem es diesen bindet und er nicht mehr für die Einleitung der Translation in Kombination mit der sRNA DsrA zur Verfügung steht. (Zhang *et al.*, 2002)

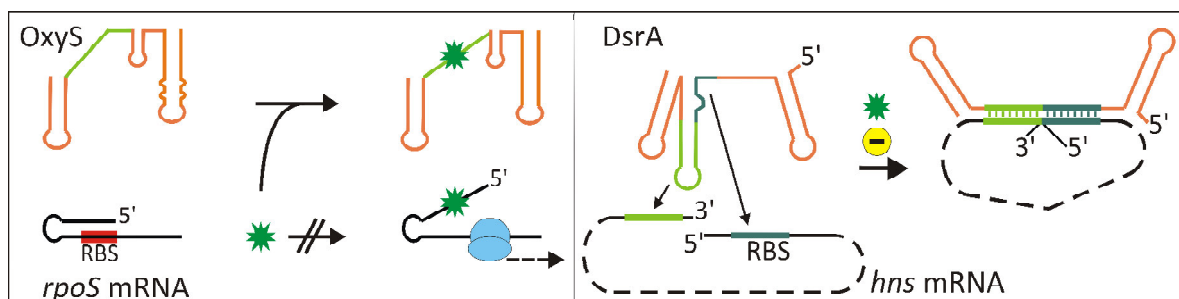


Abbildung 2.15: Repression der mRNAs *rpoS* und *hns* durch sRNAs

Links Die sRNA OxyS bindet das Protein Hfq (grüner Stern), welches für die Aktivierung der Translation der *rpoS*-mRNA nicht mehr zur Verfügung steht. **Rechts** Die mRNA *hns* wird von der sRNA DsrA gleichzeitig im 5'- und 3'-UTR gebunden und die Translation so verhindert. Das Hilfsprotein Hfq (grüner Stern) vermittelt die Reaktion beider RNAs. Entnommen und bearbeitet nach Altuvia *et al.*, 2000.

Die sRNA OxyS verwendet unterschiedliche Sequenzbereiche für die Paarung an ihre Ziel-mRNAs (vgl. hierzu Abb. 2.12 B und Abb. 2.15 A). Bei der Regulation der mRNA *rpoS* wird das Regulationsvermittelnde Protein Hfq mit einem innerhalb der Sequenz liegenden Bereich gebunden, während bei der Regulation der mRNA *fhfA* die *loop*-Regionen der beiden großen Stammschleifen eine Bindung mit der mRNA eingehen. Auch für den Regulationsmechanismus von OxyS/*fhfA* ist das Protein Hfq nötig. Die unterschiedlichen Bindestellen auf der sRNA zeigen, dass beide Strukturen, vermittelndes Protein Hfq und die mRNA *fhfA*, gleichzeitig von der sRNA gebunden werden können.

DsrA ist eine sRNA, die ebenfalls mindestens zwei unterschiedliche Ziel-mRNAs besitzt und zudem zwei verschiedene Regulationsmechanismen (Translationsinhibierung und -aktivierung) ausführen kann. Sie bindet gleichzeitig den 5'- und 3'-UTR der Ziel-mRNA *hns*. Die dadurch gebildete mRNA-Schleife maskiert die RBS, die Translation wird verhindert. An dieser Reaktion ist ebenfalls das Protein Hfq beteiligt (Abb. 2.15 B).

2.3.1.2.2.2 Genregulation durch sRNAs – Translationsaktivierung

sRNAs können die Translation nicht nur reprimieren, wobei dies tatsächlich den Hauptmechanismus darstellt, sondern auch aktivieren.

Die mRNA des Sigmafaktors RpoS ist hochstrukturiert und der 5'-UTR maskiert mit einer Stammschleife die RBS. Die sRNA DsrA löst diese Struktur durch Bindung an die mRNA auf (Abb. 2.16). Wie oben bereits erwähnt hat DsrA somit nicht nur mehrere Ziel-mRNAs, sondern vermittelt sowohl eine Translationsrepression als auch eine Aktivierung des Translationsvorgangs. (Altuvia *et al.*, 2000)

Wie zuvor beschrieben, kann eine sRNA mehrere Ziel-mRNAs regulieren. Eine mRNA kann aber auch von verschiedenen sRNAs beeinflusst werden. Die mRNA *rpoS* wird neben der sRNA DsrA noch von der zweiten sRNA RprA gebunden. Der für Stressantworten zuständige Sigmafaktor RpoS kann daher sowohl bei Kältestress (durch DsrA) als auch bei osmotischem Stress (durch RprA) aktiviert werden. (Lease & Belfort, 2000; Majdalani *et al.*, 1998) *RpoS* ist das einzig bekannte Gen, welches posttranskriptional von drei verschiedenen sRNAs reguliert wird. (Repoila *et al.*, 2003) Zusätzlich zu den beschriebenen sRNAs sind noch weitere Regulationsfaktoren, unter anderem (histon-ähnliche) Proteine, an der Regulation von *rpoS* beteiligt. (Zhang *et al.*, 1998)

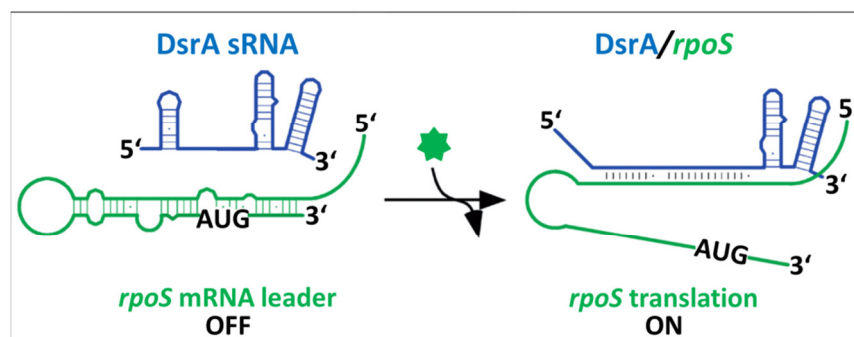


Abbildung 2.16: Bindung der sRNA DsrA an die Ziel-mRNA *rpoS*

Die sRNA DsrA bindet ihre Ziel-mRNA *rpoS* im 5'-UTR der Sequenz unter Einfluss des vermittelnden Proteins Hfq (grüner Stern). Das Startcodon liegt nun ungepaart vor, die Translation kann stattfinden. Entnommen und bearbeitet nach Hopkins *et al.*, 2009.

2.3.1.2.3 Genregulation durch sRNAs – Veränderung der mRNA-Stabilität

Die Bindung der sRNA kann die mRNA auch für einen Abbau markieren, da RNasen den doppelsträngigen Bereich der beiden gebundenen RNA-Transkripte erkennen (Abb. 2.17). Es ist auch eine Stabilisierung der mRNA möglich, indem die Bindung der Ribonuklease verhindert wird. (Brantl, 2008; Storz *et al.*, 2004)

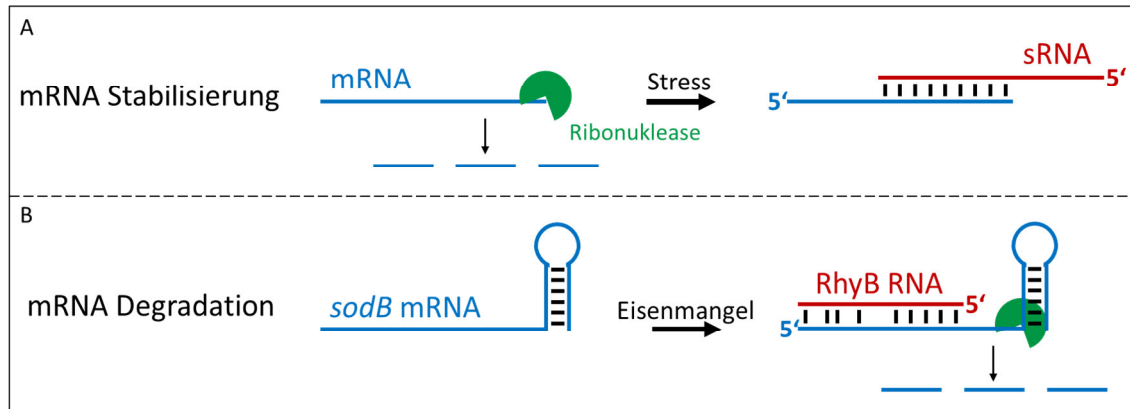


Abbildung 2.17: sRNA-bedingte Regulation der mRNA-Stabilität

A Bei einer Stabilisierung wird die mRNA durch die Bindung der sRNA vor einem Abbau durch Ribonukleasen (grün) geschützt. **B** Im Falle einer Destabilisierung führt die Bindung der sRNA an die mRNA zur Bildung eines doppelsträngigen Bereichs, der durch RNasen erkannt werden kann. Entnommen und bearbeitet nach Storz *et al.*, 2004.

2.3.1.2.4 Genregulation durch sRNAs – Kontrolle der Proteinfunktion

sRNAs sind weiterhin in der Lage, die Funktion von Proteinen zu beeinflussen. An die mRNA gebundene Proteine maskieren die RBS und verhindern die Translation. Die sRNA kann durch Bindung des Proteins diese Interaktion verhindern und die Translation ermöglichen.

Ein Beispiel hierfür ist das RNA-Bindeprotein CsrA aus *E. coli*, das die Ziel-mRNA *glgCAP* im Initiationsbereich der Translation bindet. Die Produkte des *glgCAP*-Operons regulieren normalerweise die Glycogen-Biosynthese, die Gluconeogenese und den Glycogen-Katabolismus, zudem modulieren sie die Zelloberfläche. Die sRNA CsrB konkurriert mit der Ziel-mRNA um die Bindung des CsrA-Proteins. Wenn eine Anlagerung des Proteins an die mRNA stattfindet, ist die Initiation der Translation unterbunden. Zusätzlich ist die mRNA *glgCAP* dann für einen beschleunigten Abbau markiert. Die sRNA CsrB kann mit ihren vielzähligen Bindemotiven bis zu 18 CsrA-Proteine abfangen und eine Translation gewährleisten (Abb. 2.18 grau hinterlegt). (Baker *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1997)

sRNAs sind überdies in der Lage, die Aktivität von Proteinen direkt zu beeinflussen. Eine Bindung an das aktive Zentrum kann die Proteinaktivität inhibieren oder aktivieren. Die sRNA 6S RNA aus *E. coli* erkennt den von der RNA-Polymerase gebundenen Sigmafaktor σ^{70} , wenn die Zelle einer Nährstofflimitation ausgesetzt ist. Den freien Faktor erkennt die sRNA nicht. Die Struktur der 6S RNA imitiert die Struktur eines offenen Promotors auf der DNA (Abb. 2.19). Die RNA-Polymerase wird durch Bindung der 6S RNA am aktiven Zentrum des Proteins abgefangen. Die Transkription einiger *housekeeping*-Gene wird so blockiert. Der offene, große Bereich in der Mitte der Sekundärstruktur ist essentiell für deren Funktion.

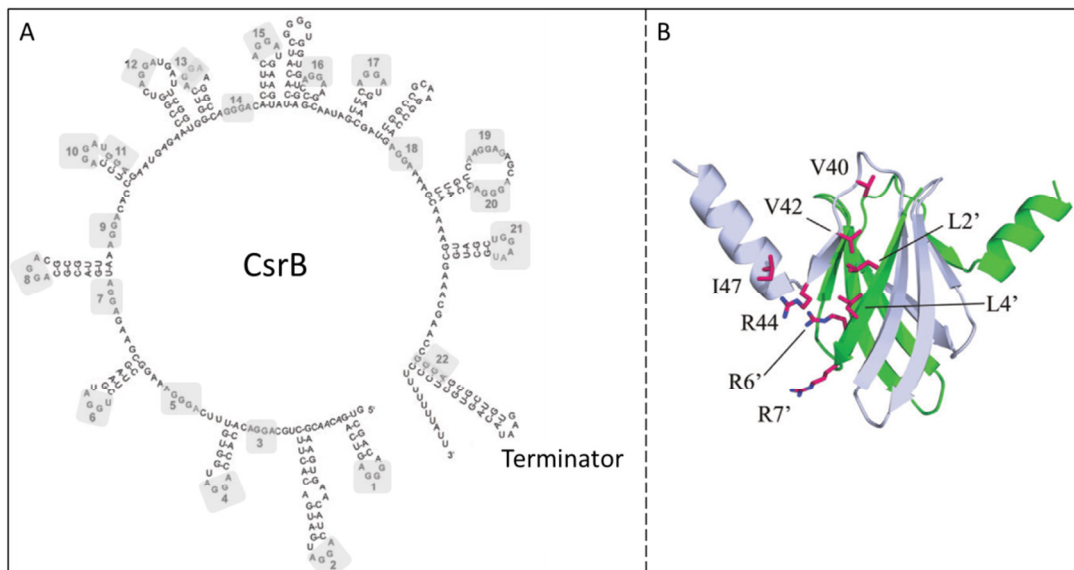


Abbildung 2.18: Die proteinbindende regulatorische sRNA CsrB mit ihrem Ziel-Protein CsrA

A Die sRNA CsrB kann mit Hilfe der Bindemotive (grau hinterlegt) ihrer Stammschleifen und ungepaarten Sequenzbereiche bis zu 18 CsrA-Proteine binden. **B** Struktur des Proteins CsrA. Die möglichen CsrB-Bindestellen sind nummeriert. Entnommen und bearbeitet nach Wood, 2009.

Die 6S RNA beinhaltet selbst einen Transkriptionsstart, der im Falle erhöhten Nährstoffangebots erkannt wird und die RNA-Polymerase die sogenannte pRNA (Abb. 2.,19 Pfeil) synthetisieren kann. Der 6S RNA-pRNA-Komplex löst sich von der RNA-Polymerase und die 6S RNA wird degradiert. (Wassarman, 2007; Wassarman & Saecker, 2006)

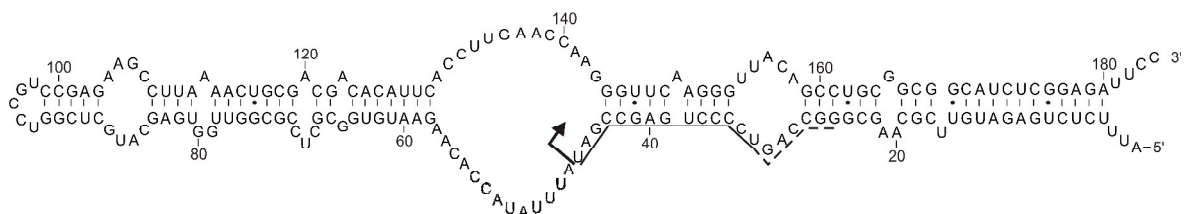


Abbildung 2.19: Sekundärstruktur der 6S RNA aus *E. coli*

Die Struktur der 6S RNA imitiert die Struktur eines offenen Promotors und fängt so die RNA-Polymerase ab. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart der pRNA. Die Linie bzw. gestrichelte Linie stellt die möglichen Längen der pRNA dar. Entnommen und bearbeitet nach Wassarman, 2007.

Im Falle der RNA-Polymerase aus Hefe ist die Bindung der FC-sRNA an das aktive Zentrum essentiell für die Aktivität des Proteins. (Windbichler *et al.*, 2008) Auch in höheren Eukaryoten konnte in der Maus die ncRNA (*non-coding* RNA) B2 identifiziert werden, die direkt am aktiven Zentrum der RNA Polymerase II bindet und nach einem Hitzeschock auf transkriptioneller Ebene spezifische Gene reprimiert. (Goodrich & Kugel, 2006)

2.3.1.3 Das RNA-Chaperon Hfq

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sRNAs mit Hilfe des Proteins Hfq an ihre Ziel-mRNA binden. Dieses ringförmige Homohexamer ist einer der häufigsten in der Zelle auftretenden Proteine und wird in die Familie der LSm-Proteine eingeteilt. Diese binden immer an RNA und sind unter

anderem am Spleißprozess in Eukaryoten beteiligt. Darüber hinaus kommen sie auch in Archaeen vor (Abb. 2.20). (Sun *et al.*, 2002)

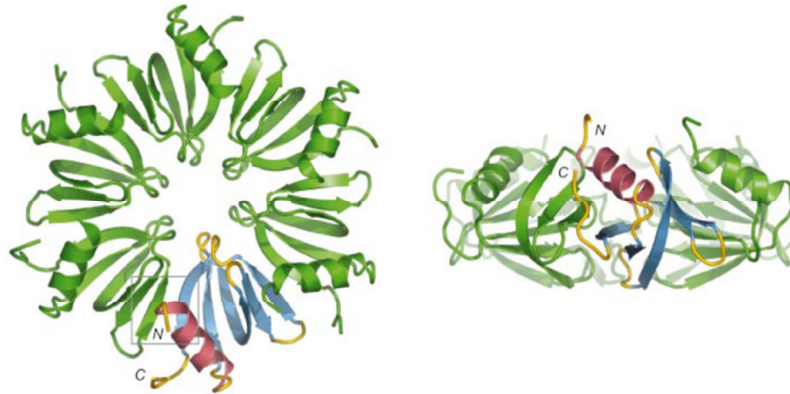


Abbildung 2.20: Struktur des Hfq-Proteins

Links Aufsicht des hexameren Hfq-Proteins. Ein Monomer ist exemplarisch farbig abgehoben. Die N-terminale α -Helix ist in rot, die fünf folgenden β -Faltblätter sind in blau dargestellt. **Rechts** Seitenansicht des Proteins. Entnommen und bearbeitet nach Sauter *et al.*, 2003.

Das Chaperon bindet an eine mRNA und bewirkt eine konformationelle Umfaltung der mRNA-Sekundärstruktur. Daraufhin kann die sRNA ebenfalls an die mRNA binden, was die Translation reprimiert (Abb. 2.21 A) oder aktiviert (Abb. 2.21 B).

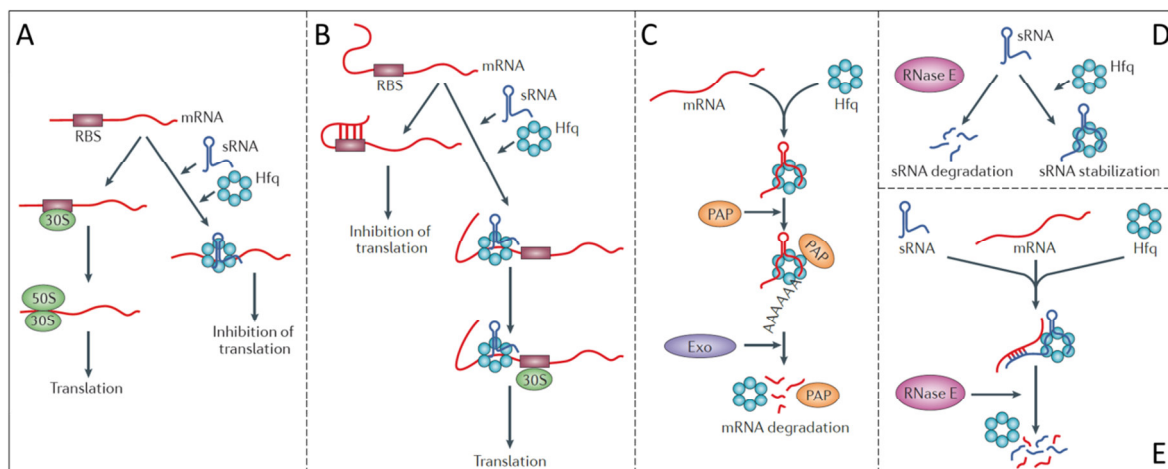


Abbildung 2.21: Hfq vermittelte Prozesse

A Das Protein Hfq bindet die sRNA und der Protein-RNA-Komplex kann die mRNA im Translationsinitiationsbereich binden und die Initiation verhindern. **B** Der sRNA-Hfq-Komplex bindet die mRNA und die ausgelösten Strukturveränderungen demaskieren die RBS, sodass die Translation initiieren kann. **C** Die Bindung von mRNA und dem Hfq-Protein vermittelt eine mögliche Polyadenylierung durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) und die anschließende Degradierung durch eine Exoribonuklease (Exo). **D** Die Komplexierung der sRNA mit Hfq kann die RNA vor dem Abbau durch RNase E schützen. **E** Auch die Spaltung des sRNA-mRNA-Komplexes durch RNase E kann durch das Hfq-Protein vermittelt werden. Entnommen und bearbeitet nach Vogel & Luisi, 2011.

Der Abbau einer bzw. beider RNAs kann ebenfalls durch Hfq bedingt werden, ebenso wie deren Stabilität. Wird mRNA vom Protein gebunden, kann sie polyadenyliert und durch Exoribonukleasen verdaut werden (Abb. 2.21 C). Zudem stabilisiert Hfq die Sequenz von sRNAs.

Wenn das Protein eine sRNA bindet, wird diese nicht durch RNase E erkannt und ist dementsprechend vor dem Abbau geschützt (Abb. 2.21 D). Des Weiteren kann Hfq die Degradation des mRNA-sRNA-Hfq-Komplexes vermitteln (Abb. 2.21 E). Bei der Extraktion von Hfq-Proteinen aus *E. coli* wurden 20% von ihnen in Verbindung mit RNase E aufgereinigt, was die vermittelnde Funktion des Hfq-Proteins in Bezug auf die RNA-Degradation bestätigt. (Morita *et al.*, 2005)

Ein Beispiel dieses Hfq-vermittelten Mechanismus ist die Interaktion der sRNA RyhB mit der Ziel-mRNA *sodB* in *E. coli* (Abb. 2.22). Die Bindung des Proteins an sRNA und mRNA ist für die Translationsrepression und den anschließenden Abbau durch RNase E essentiell. (Geissmann & Touati, 2004) Die Verbreitung des Hfq-Proteins ist in Gram-negativen Bakterien sehr hoch. In Gram-positiven Bakterien wie *S. coelicolor* ist solch ein bindungsvermittelndes Protein derzeit noch nicht bekannt. (Sun *et al.*, 2002; Vockenhuber & Suess, 2012)

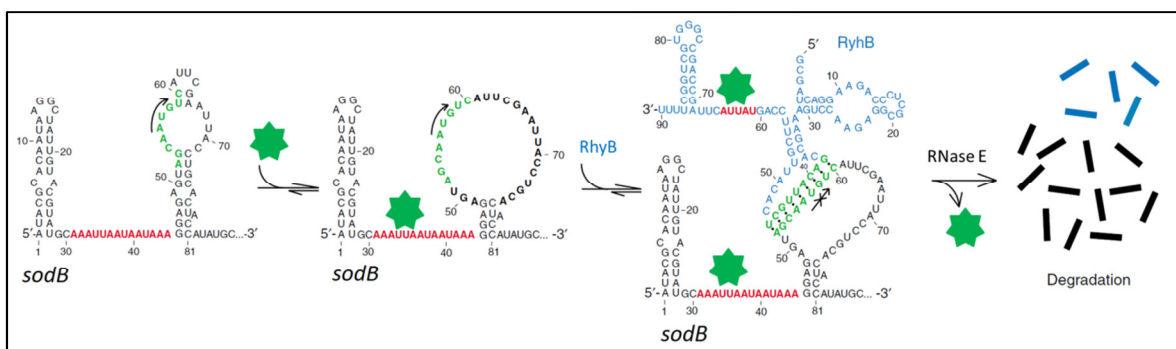


Abbildung 2.22: Regulations- und Degradationsmechanismus der RyhB-sodB-Interaktion

Die mRNA *sodB* (schwarz) bindet Hfq (grüner Stern) und vermittelt eine Strukturveränderung der mRNA. Mit dem offenen, großen loop kann die sRNA RyhB (blau) interagieren. Das Startcodon ist verdeckt, die Translation kann nicht ablaufen. Der Komplex wird von RNase E abgebaut. Entnommen und bearbeitet nach Geissmann & Touati, 2004.

2.3.1.4 Methoden der sRNA-Identifikation

In den Anfängen der Erforschung regulatorischer RNAs wurden sRNAs durch Gelelektrophorese radioaktiv markierter RNA mit anschließendem Nukleaseverdau (*footprinting*) detektiert. (Altuvia, 2007; Hindley, 1967) Bei diesem Verfahren ist jedoch ein hohes Expressionslevel der sRNA nötig, um die Detektionsgrenze nicht zu unterschreiten. Viele der so identifizierten sRNAs sind an höher exprimierten *housekeeping*-Funktionen oder Regulationsprozessen beteiligt. Hierzu zählen die bereits erwähnte 6S RNA, oder die asRNA Spot 42 aus *E. coli*. Spot 42 reguliert den Kohlenstoff-Stoffwechsel und wird von Glucose induziert. (Møller *et al.*, 2002; Vogel & Sharma, 2005)

Das Anfärben durch Ethidiumbromid oder die Silberfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrenntem Gesamt-RNA-Extrakt war in einigen Fällen ebenfalls zielführend. Diese Methode ersparte den Umgang mit radioaktivem Material. sRNAs konnten auf diesem Weg in *Bacillus subtilis* und *Mycoplasma pneumoniae* ermittelt werden. (Ando *et al.*, 2002; Göhlmann *et al.*, 2000) Im Anschluss wurde eine so separierte RNA sequenziert und die Sequenz in einer bioinformatischen BLAST-Suche (H1) verwendet.

In Extrakten von Gesamt-RNA kann ebenfalls nach sRNAs gesucht werden. Dazu wird an die 5'- oder 3'-Enden der RNAs eines RNA-Extrakts eine Oligonukleotid-Bindestelle (*linker*) ligiert. Anschließend wird die RNA mit zur *linker*-Sequenz passenden Oligonukleotiden durch eine

Reverse Transkriptase-PCR in cDNA umgeschrieben und sequenziert. Die Methode liefert eine basengenaue Analyse der RNA-Sequenz, doch gerade in Bezug auf die meist hochstrukturierten Sekundärstrukturen einer sRNA ist die Ligation der Oligonukleotid-Bindestelle oft erschwert oder unmöglich. (Vogel & Sharma, 2005)

Die größte Vereinfachung der sRNA-Suche wurde im Feld der RNomics bzw. des RNA-Seq (*next generation sequencing*) gemacht. Hierbei wird RNA in cDNA umgeschrieben und diese anschließend sequenziert (RNA-Seq). Es kann Gesamt-RNA-Extrakt oder RNA-Extrakt bestimmter Wuchsphasen bzw. Anzuchtbedingungen verwendet werden. Beim heutigen RNA-seq werden die neuesten Sequenzierungstechniken wie 454 Pyrosequenzierung, SOLEXA oder SOLID angewendet, die die cDNA direkt analysieren können und die Subklonierung überflüssig machen. (Sharma & Vogel, 2009; Vogel & Sharma, 2005) Der Vorteil dieser Methode ist, dass innerhalb kurzer Zeit große Datenmengen zur Verfügung stehen und die Nachweisgrenze sehr niedrig ist. Bereits bei einer geringen Expression der sRNAs können diese erfasst werden. Zugleich stellt sich dies als ein Problem dar, denn alle durch *in silico* Analysen identifizierten potentiellen sRNAs müssen durch experimentelle Verfahren, wie Northern Blot-Analyse oder Microarray, validiert werden. Auch PCR-Methoden (RT-PCR) wurden zur Verifizierung genutzt. (Panek *et al.*, 2008) Die Nachweisgrenzen der experimentellen Validierung sind oft höher als die der Sequenzierung, weshalb sequenziell belegte sRNAs später oft nicht mehr nachgewiesen werden können. Zusätzlich erschwert die hochstrukturierte Form regulatorischer RNAs deren Identifikation *in silico* wie auch *in vivo*. (Altuvia, 2007)

Die bioinformatische Suche wird mit einer stetig wachsenden Anzahl zur Verfügung stehender, vollständiger Genomsequenzen der unterschiedlichsten Organismen immer leichter. Bei der Suche nach regulatorischen RNAs in genomischen Sequenzen werden verschiedene Merkmale betrachtet. In intergenen Regionen werden Promotor- und Terminationssequenzen ermittelt, und deren Konservierung untersucht. Auch die Konservierung der intergenen Sequenz wird in die Suche nach sRNAs einbezogen. Für die Suche nach asRNAs kann dies auch auf die kodierenden Bereiche des Genoms ausgeweitet werden. (Altuvia, 2007)

Der Vorteil eines Microarrays liegt in der hohen Abdeckung. Es können die Transkriptome verschiedener Wuchsphasen, Stresssituationen oder Mutanten wie Überexpressionen und Deletionen einer sRNA untersucht werden. Der Microarray muss dabei für die intergenen Regionen des Genoms konzipiert sein, da sie üblicherweise für die Analyse von annotierten Genen genutzt werden. (Altuvia, 2007; Vogel & Sharma, 2005)

Bislang unbekannte sRNAs können auch durch eine Affinitätschromatographie detektiert werden. Hierfür eignet sich z.B. das sRNA-Bindeprotein Hfq, welches etwa ein Drittel der sRNAs in *E. coli* binden soll. Es können jedoch auch andere Proteine wie Sigmafaktoren verwendet werden, bei denen eine Interaktion mit regulatorischen RNAs vermutet wird. Die Proteinmatrix wird mit RNA-Extrakt inkubiert und nach einigen Waschschritten werden die gebundenen RNA-Moleküle eluiert. In *E. coli* konnten durch Immunpräzipitation mit anschließender Microarray-Analyse sechs neue sRNAs determiniert werden. (Vogel & Sharma, 2005; Zhang *et al.*, 2003) Mit dieser Methode können Hfq-bindende sRNAs detektiert werden. Im Anschluss muss nicht zusätzlich überprüft werden, ob die sRNA Hfq bindet.

Eine Coimmunopräzipitation (CoIP) von sRNA-Protein-Komplexen ist möglich, wenn für die Proteinkomponente Antikörper verfügbar sind. Für das sRNA-Bindeprotein Hfq sind Antikörper vorhanden und können für eine CoIP mit anschließender Microarray-Analyse verwendet werden.

In *Pseudomonas aeruginosa* konnten über ColP sRNAs ermittelt werden. Die Kombination von ColP mit RNomics und bioinformatischem Vorgehen konnte vier neue sRNAs identifizieren. (Sharma & Vogel, 2009; Sonnleitner *et al.*, 2008) Die Verwendung eines FLAG-tag-Epitops, eingebracht am chromosomalen Hfq-Gen, wurde in *Salmonella* getestet. Das Protein konnte dadurch von einem Standard-Antikörper gebunden werden. (Sharma & Vogel, 2009; Sittka *et al.*, 2008)

Die Suche nach regulatorischen RNAs kann auch über ein funktionales *Screening* durchgeführt werden. Genomische Sequenzen, zufällig ausgewählt oder Gegenstand einer laufenden experimentellen Untersuchung, werden auf Plasmiden inseriert und überexprimiert. Die Transformanten werden auf Phänotypen untersucht und die Plasmide der Kolonien mit ungewöhnlichem Phänotyp sequenziert. Die darauf enthaltenen Sequenzen werden in weiteren Versuchen einzeln getestet bzw. geben eventuell aus der Sequenz oder Struktur heraus bereits Aufschluss über den Auslöser der phänotypischen Veränderung. Die erste chromosomal nachgewiesene sRNA MicF konnte in dieser Weise detektiert werden. (Mizuno *et al.*, 1984)

2.3.1.5 Identifikation von Ziel-mRNAs

Wenn eine oder mehrere sRNAs determiniert werden konnten, ist der nächste Schritt die Charakterisierung ihrer Funktion.

Ein gängiges Vorgehen ist die Veränderung der Expressionsstärke durch Überexpression oder Deletion. Für eine Überexpression wird die sRNA-Sequenz unter die Kontrolle eines starken Promotors gestellt. Eine Verringerung der Kopienanzahl der sRNA kann durch Einbringen einer *antisense* RNA erreicht werden. Die *antisense* Sequenz soll durch perfekte Basenpaarung mit der sRNA zu einem Abbau des Transkripts führen. Dieses Vorgehen kann jedoch meist nur eine Reduzierung der sRNA bedingen, aber keine vollständige Entfernung des Transkripts. Die Herstellung einer Deletionsmutante ist daher einer *antisense* vermittelten Transkriptreduzierung vorzuziehen. Eine Deletion wird chromosomal durch homologe Rekombination erzeugt und ist deshalb langwieriger zu erstellen als die plasmidkodierte Variante. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgangs ist Kapitel 3.5.2.1 zu entnehmen. Die veränderte Kopienanzahl der sRNA, herauf- oder herunterreguliert, wird vermutlich eine Veränderung im Organismus induzieren. Im besten Falle verursacht dies einen sichtbaren Phänotyp, der die weiteren Charakterisierungsschritte bestimmt. Ist kein direkter Phänotyp sichtbar, müssen weitere Versuche mit den Überexpressions- und Deletionsstämmen durchgeführt werden. Die Überexpression der sRNA MicA konnte z.B. erfolgreich *ompA* als Ziel-mRNA in *E. coli* identifizieren. (Udekwu *et al.*, 2005) Des Weiteren kann die Auftrennung von Proteinrohextrakten der Überexpressions- und Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp in 1D- oder 2D-Polyacrylamidgelen unterschiedliche, sRNA-induzierte Proteinmuster aufzeigen. Das Protein auffälliger Banden kann massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Ziel-mRNA *metE* der sRNA scr5239 aus *S. coelicolor* konnte über eine 1D-Gel-Analyse detektiert werden. (Vockenhuber *et al.*, 2015)

Das Genom eines Organismus vollständig sequenzieren zu können, ermöglichte die einfachere Detektion von neuen, bisher nicht annotierten Transkripten. Die Suche nach sRNAs hat sich deshalb stark vereinfacht. Die Suche nach potentiellen Ziel-mRNAs mit bioinformatischen Mitteln ist allerdings immer noch schwierig. sRNAs benötigen für die Paarung an ihre Ziel-mRNA keine perfekte Komplementarität. Sie können einzelne oder kurze Sequenzbereiche aus der Paarung auswölben, wie im Fall der sRNA OxyS. Hier liegen sogar 45 nt zwischen den beiden, die

Interaktion ausführenden, *loop*-Regionen. Zudem haben sRNAs keine *seed*-Region wie miRNAs in Eukaryoten, die für die Interaktion zuständig ist. Vielmehr können sie unterschiedliche Sequenzbereiche für die Interaktion mit verschiedenen Ziel-mRNAs oder Proteinen nutzen. Auch hier dient die sRNA OxyS als entsprechendes Beispiel. In Streptomyceten kommt der hohe GC-Gehalt hinzu. In Kombination mit sich auswölbenden Sequenzbereichen kann man für die potentielle Interaktionssequenz einer sRNA fast überall im Genom Bindestellen finden. Des Weiteren sind Promotorsequenzen in Streptomyceten bislang nur rudimentär untersucht, was die bioinformatische Suche erschwert, ebenso wie die Rho-unabhängig ablaufende Termination. Auch die alternative Verwendung der Codons GUG und UUG als Startcodon neben AUG behindern die bioinformatische Erschließung des Organismus. (Vockenhuber *et al.*, 2011)

Ein experimenteller oder bioinformatischer Hinweis auf eine potentielle Ziel-mRNA kann durch eine Reportergergenmessung überprüft werden. Die Promotorregion (der 5'-UTR und die ersten Basen des möglichen Ziel-Gens) wird vor ein Reportergergen inseriert. Das verwendete Plasmid enthält gleichzeitig die Sequenz der sRNA unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors. Als Kontrolle wird ein Plasmid mitgeführt, auf dem nur die Reportergergenfusion enthalten ist. Reguliert die sRNA die mRNA, deren Promotorregion inseriert wurde, sollte die Expression des Reportergergens von der Kontrollexpression abweichen. Als Reportergergen stehen unter anderem das *green fluorescent protein* (GFP) und die β -Galactosidase zur Verfügung. Da Streptomyceten eigene β -Galactosidasen besitzen, wurde als Reportergergen dieser Arbeit die β -Glucuronidase verwendet. (Myronovskiy *et al.*, 2011) Urban *et al.* konnten 2007 Reportergergenfusionen zur Bestätigung von sRNA-mRNA-Interaktionen in *E. coli* nutzen. (Urban & Vogel, 2007)

2.3.1.6 sRNAs in Streptomyceten

Unterschiedliche Arbeitsgruppen untersuchen seit 2008 sRNAs in Streptomyceten. Für die ersten Suchen nach regulatorischen RNAs wurden die damals bekannten Genomsequenzen der Streptomyceten-Arten genutzt. In deren Sequenz wurde nach konservierten RNA-Transkripten in intergenen Regionen gesucht.

Die Arbeitsgruppe um Jiří Vohradský der Universität in Prag unternahm 2008 die erste Suche nach sRNAs in *S. coelicolor* und *S. avermitilis*. Sie nutzten eine bioinformatische BLAST-Suche, um konservierte Bereiche in intergenen Regionen zu identifizieren. Diese wurden dann auf das Vorhandensein von Rho-unabhängigen Terminatoren untersucht. 32 intergene Regionen mit vorhergesagten sRNAs wurden in einer Microarray-Analyse überprüft. Die Expression von 20 Transkripten wurde nachgewiesen. Neun der 20 Transkripte konnten durch *Real Time*-PCR validiert werden. Die Suche nach homologen Sequenzen bereits bekannter sRNAs wie Spot42 oder MicF erbrachte nur eine der 6S RNA aus *E. coli* ähnliche Struktur. (Panek *et al.*, 2008)

Im gleichen Jahr folgte eine Suche nach sRNAs in der Kernregion des Genoms mehrerer Streptomyceten-Arten durch das kanadische Labor von Marie A. Elliot. Auch hier wurde eine bioinformatische Suche nach konservierten Promotor- oder Terminatorregionen durchgeführt. Sie kombinierten eine bioinformatische BLAST-Suche mit dem Programm sRNA Finder. Dieses Programm berücksichtigt die Konservierung von Sekundärstrukturen bei der sRNA Suche. Eine Northern Blot-Analyse der potentiellen Kandidaten konnte sechs sRNAs bestätigen – zwei davon waren auch von Panek *et al.* gefunden worden. (Swiercz *et al.*, 2008)

Ein Jahr später analysierte Takeaki Tezuka an der japanischen Universität von Tokyo sRNAs in den Streptomyceten *S. coelicolor*, *S. griseus* und *S. avermitilis*. Durch eine bioinformatische Analyse

der Genomsequenzen wurden 321 interessante Transkripte in intergenen Regionen entdeckt. Zu kleine bzw. große RNA-Transkripte wurden ausgeschlossen, ebenso wie rRNAs und tRNAs. Eine minimale Distanz zu benachbarten Genen wurde vorausgesetzt, um asRNAs aus der Suche auszuschließen. Von den noch 54 verbleibenden Kandidaten konnten 12 durch Northern Blot-Analyse und RT-PCR validiert werden. Sieben davon zeigten eine Wachstumsphasenabhängigkeit. Nur zwei der sRNAs waren auch von der Vohradský-Gruppe ein Jahr zuvor ermittelt worden und nur eine einzelne sRNA überschneidet sich mit den Ergebnissen von Swierz *et al.* (Tezuka *et al.*, 2009)

Im Jahr 2011 wurde das Gesamt-Transkriptom von *S. coelicolor* durch Vockenhuber *et al.* sequenziert und untersucht. Die Sequenz wurde auf in intergenen Regionen gelegene Promotor- und Terminatorstrukturen überprüft. Es wurde nach Transkripten gesucht, die mindestens 79 nt lang waren. Zudem mussten sie wenigstens 60 nt vom nächsten, auf dem gleichen Strang kodierten Gen entfernt sein. Auf eine mehrfache Sequenzierung des 5'-Endes wurde geachtet, um auszuschließen, dass es sich um unspezifische Signale handelte. Mit annotierten Genen überlappende Transkripte wurden ausgeschlossen. Neben einer stringenten bioinformatischen Suche war die Validierung der Befunde von elementarer Bedeutung, denn nicht alle *in silico* identifizierten potentiellen Transkripte können auch *in vivo* nachgewiesen werden. Nur 11 der 63 ermittelten sRNAs konnten experimentell verifiziert werden. Eine Funktion dieser Transkripte ist bislang nicht bekannt. (Vockenhuber *et al.*, 2011)

Zwei Jahre später unternahm das Labor von Marie Elliot einen erneuten Versuch in *S. coelicolor*, *S. avermitilis* und *S. venezuelae* regulatorische RNAs zu identifizieren. RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen wurde sequenziert und diesmal nicht nur auf sRNAs sondern auch auf asRNAs untersucht. In diesem Ansatz wurden 90 neue sRNAs in *S. coelicolor* gefunden, von denen 71 bislang unbekannt waren. In den beiden anderen Streptomycceten-Arten wurden deutlich mehr neue sRNAs gefunden. Da es in diesen Organismen die erste Suche nach regulatorischen RNAs war, überrascht dies wenig. In allen drei Arten zeigten die gefundenen sRNAs eine starke Abhängigkeit von der Wachstumsphase. (Moody *et al.*, 2013)

2.3.1.6.1 Funktionen von sRNAs in *S. coelicolor*

Trotz der Tatsache, dass mehrere Arbeitsgruppen sich bereits seit langem mit sRNAs in Streptomycceten und speziell in *S. coelicolor* befassen, ist die Anzahl charakterisierter sRNAs überschaubar.

Die antisense RNA cnc2198.1 konnte als Regulator der *glnA*-mRNA identifiziert werden. Es konnte ein negativer Effekt auf die Glutamin Synthetase I (SCO2198) festgestellt werden. Dieses Protein ist ein zentrales Enzym des Stickstoff-Stoffwechsels und verbindet zudem die Stickstoff-Assimilation mit der Antibiotika-Synthese. Die Expression der antisense-Sequenz von cnc2198.1 wirkte wuchshemmend auf *S. coelicolor* und beeinflusste die Produktion von Undecylprodigiosin. (D'Alia *et al.*, 2010)

Die 159 nt lange, hochkonservierte sRNA scr5239 reguliert zwei Ziel-mRNAs in *S. coelicolor*, die Agarase DagA und die Methioninsynthase MetE. Auch die Actinorhodinsynthese wird durch scr5239 beeinflusst. Die Translation von *dagA* wird von scr5239 durch Basenpaarung mit der mRNA etwa 40 nt *downstream* des Startcodons reprimiert. Die mRNA *metE* wird in ihrem 5'-UTR über die Basen 3-10 gebunden und die Translation inhibiert. In beiden Fällen bindet die sRNA ihre Ziel-mRNAs innerhalb der kodierenden Region. Dieser Mechanismus ist zwar bekannt, aber eher ungewöhnlich. Die Interaktion der regulierenden sRNA mit ihrer Ziel-mRNA blockiert sonst

vornehmlich die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon. (Vockenhuber *et al.*, 2015; Vockenhuber & Suess, 2012)

Der asRNA scr4677 konnte zumindest die potentielle Regulation des SCO4676/SCO4677-Operons zugeordnet, wenn auch noch nicht vollends aufgeklärt, werden. Die 70 nt lange asRNA wird *antisense* zum Gen SCO4676 kodiert. SCO4676 ist als hypothetisches Protein annotiert. scr4677 wurde in verschiedenen Medien differenziell exprimiert und zeigte zudem eine medienabhängige, alternative Prozessierung. Es konnte beobachtet werden, dass die asRNA das polycistronische Transkript der benachbarten Gene SCO4676 und SCO4677 stabilisiert. Einzeltranskripte von SCO4676 wurden hingegen destabilisiert. Eine mögliche Erklärung war, dass der asRNA im polycistronischen Transkript eine zugängliche Bindestelle zur Verfügung steht. Die gepaarten Transkripte von asRNA und SCO4676/SCO4677-mRNA maskierten eine RNase E-Bindestelle und konnten das Transkript stabilisieren. Eine spezifische Regulation durch die asRNA, wie etwa eine Regulation durch Maskierung der Ribosomenbindestelle, konnte bislang nicht beobachtet werden. (Hindra *et al.*, 2014)

2.4 Ziel dieser Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurden elf neue sRNAs in *S. coelicolor* identifiziert und verifiziert (Abb. 2.23). (Vockenhuber *et al.*, 2011)

3 Ergebnisse

3.1 sRNAs aus *S. coelicolor* dieser Arbeit

Durch Transkriptomanalyse konnten in unserer Arbeitsgruppe elf sRNAs in *S. coelicolor* identifiziert werden. (Vockenhuber *et al.*, 2011) Ziel dieser Arbeit war es, diese genauer zu charakterisieren. Sieben der elf validierten sRNAs, scr2736, scr2952, scr3920, scr4115, scr4389, scr4632 und scr6925, wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Transkripte wurden ausgewählt, da sich ihre Länge im Northern Blot und der Sequenzierung konstant zeigte und die Transkripte keiner offensichtlichen Prozessierung unterlagen, wie es bei sRNAs häufig vorkommt. Zudem spielte die Detektierbarkeit des Expressionslevels und dessen Änderung innerhalb verschiedener Wachstumsphasen eine große Rolle. scr2736 wurde aufgrund ihres sehr intensiven Expressionslevels ebenfalls zur weiteren Arbeit ausgesucht, obwohl die detektierte Transkriptlänge im Northern Blot und der Sequenzierung sehr unterschiedlich war.

Zwei sRNAs (scr4632 und scr6925) wurden besonders detailliert untersucht. Ihr Expressionsmuster ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

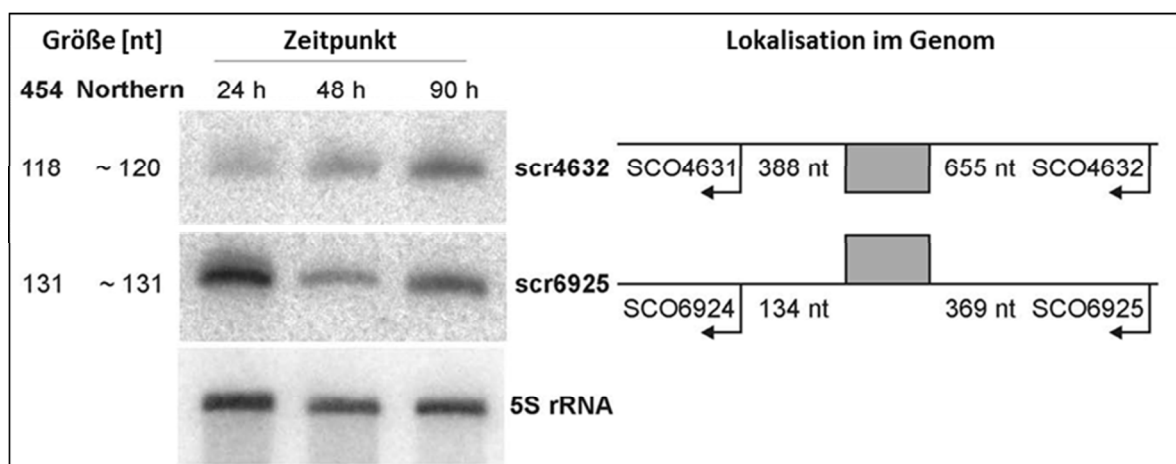


Abbildung 3.1: Northern Blot-Analyse zur Expressionsbestimmung potentieller sRNA-Transkripte

Expressionsanalyse von scr4632 und scr6925. Es wurde Wildtyp-RNA der unterschiedlichen Wachstumsphasen von lag-, log- und stationärer Phase (24 h, 48 h, 90 h) von *S. coelicolor* verwendet. Die im Sequencing (454) vorhergesagten Transkriptlängen wurden den im Northern Blot ermittelten Längen gegenübergestellt. Die Lokalisation der sRNA-Transkripte (graue Box) im genomischen Kontext ist angegeben. Entnommen und bearbeitet nach Vockenhuber *et al.*, 2011.

Die Nomenklatur der sRNAs in *S. coelicolor* richtet sich dabei nach ihrer Lokalisation im Genom. Sie sind benannt nach dem ihnen nachfolgenden Gen. Die sRNA scr2736 bedeutet beispielsweise: *S. coelicolor*-sRNA-upstream-des-Gens-2736.

3.2 Untersuchung von sRNAs in *S. coelicolor*

3.2.1 Lokalisation der sRNA-Kandidaten im Genom

Die Lage der untersuchten sRNA-Sequenzen im Genom ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Nur für einige der benachbarten Gene ließ sich eine genaue Annotation finden. SCO2736 ist als *citA* (Citratsynthase) annotiert. SCO3919 wird als *abaB* (ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie) beschrieben, SCO3920 als *cysA* (Cystathionin/Methionin γ -Synthase/Lyase). Beide Gene flankieren die sRNA scr3920. Alle übrigen in der Abbildung gezeigten Gene sind lediglich mit einer möglichen Funktion beschrieben oder sogar nur als hypothetisches Protein annotiert.

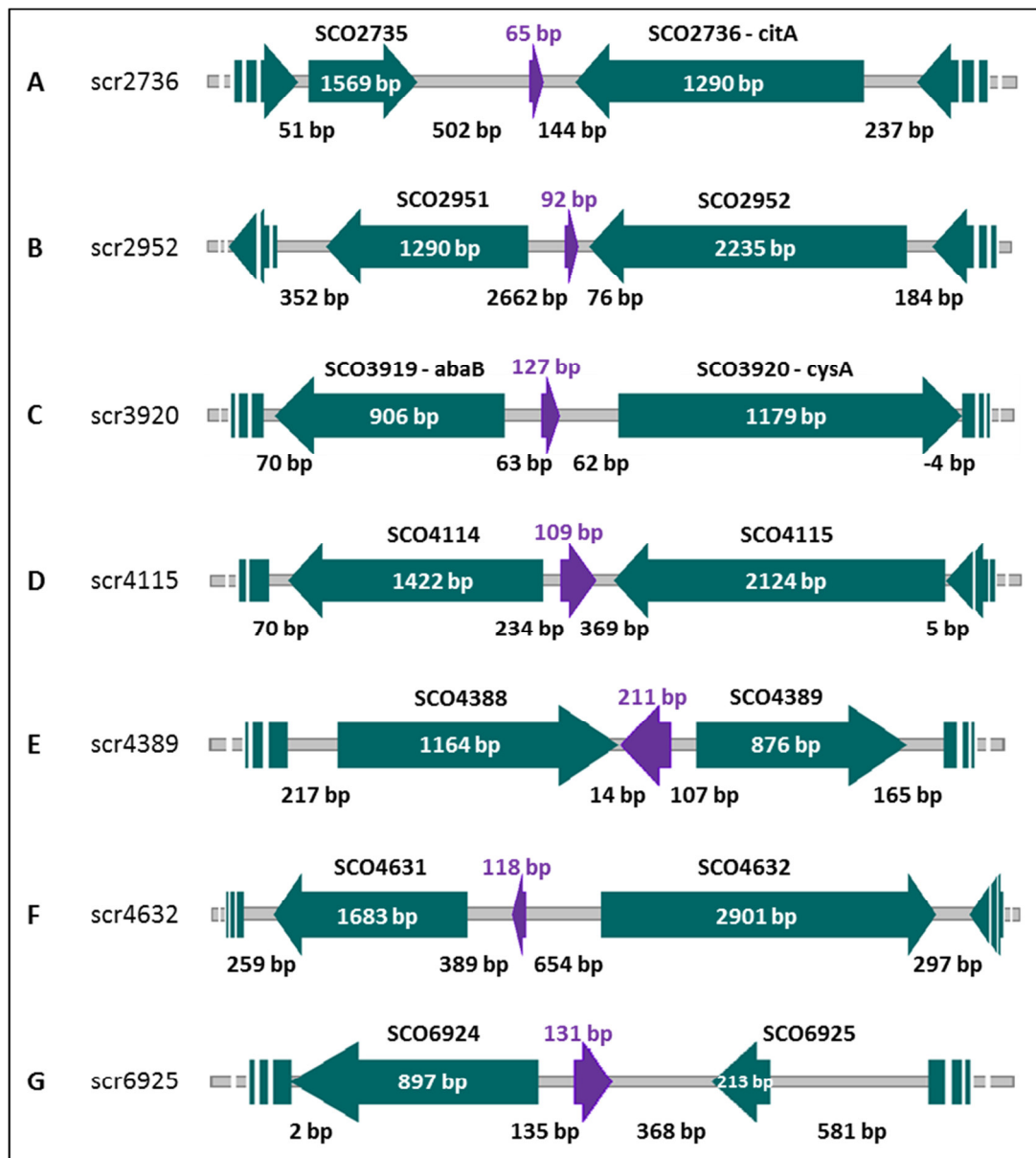


Abbildung 3.2: Genomische Lokalisation der bearbeiteten sRNAs in *S. coelicolor*

Die Lage und Länge der sRNAs (violett) ist im genomischen Kontext dargestellt. Die umliegenden Gene sind in dunkelgrün dargestellt, deren Länge in weißer Schrift. Die Abstände der Gene zueinander und zur sRNA sind angegeben. Auf dem Plusstrang kodierte Transkripte zeigen nach rechts, Transkripte des Minusstrangs nach links.

Die relative Lage der sRNAs im Genom von *S. coelicolor* wurde ebenfalls analysiert. Nur eine der sieben für die Bearbeitung ausgewählten sRNAs (scr6925) ist in einer der distalen Arm-Regionen des Genoms lokalisiert. Diese äußeren Bereiche des Chromosoms kodieren hauptsächlich für Sekundärmetabolite und Exoenzyme. Die übrigen sechs Kandidaten sind in der (zumeist *housekeeping*-Funktionen kodierenden) Kern-Region des Chromosoms zu finden (Abb. 3.3). (Bentley *et al.*, 2002)

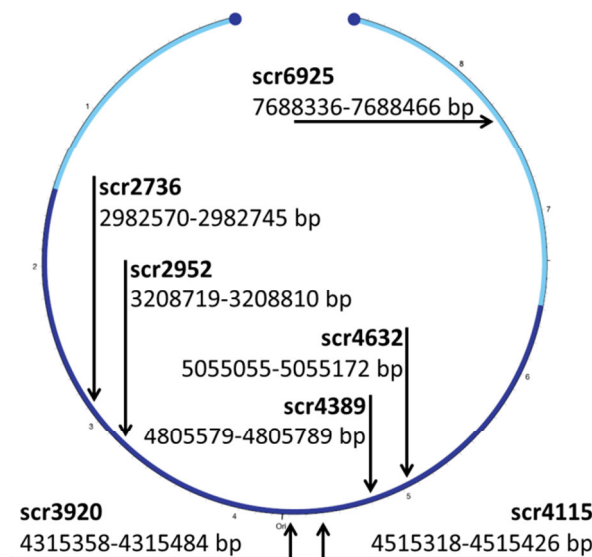


Abbildung 3.3: Lage der sRNAs im Genom von *S. coelicolor*

Sechs der in dieser Arbeit untersuchten sRNAs sind in der Kern-Region (dunkelblau) des Chromosoms lokalisiert. Nur eine der sRNAs (scr6925) ist in der äußeren Arm-Region (hellblau) kodiert. Entnommen und bearbeitet nach Bentley *et al.*, 2002.

3.2.2 Vorhersage der Sekundärstrukturen der sRNAs

Die Programme *RNAfold* und *mfold* stellen eine Möglichkeit dar, die Sekundärstruktur von RNA-Sequenzen zu berechnen [H4, H7]. Die Programme berechnen die minimale freie Energie und falten die Sequenzen in die energetisch günstigste Form. Gerade bei Streptomycceten sind oft mehrere Faltungen möglich, da die GC-reiche Sequenz viele alternative Basenpaarungen eingehen kann. Beide Programme wurden herangezogen, um zu den bearbeiteten sRNAs die wahrscheinlichste Sekundärstruktur vorherzusagen.

Abbildung 3.4 zeigt die Sekundärstrukturen der sRNAs scr4632 und scr6925. Die Strukturvorhersage der Sequenz der sRNA scr4632 ergab sowohl mit dem Programm *RNAfold* als auch mit *mfold* die gleiche Sekundärstruktur (Anhang, Abb. 6.6). Die Struktur faltete sich in eine kleinere und zwei längere Stammschleifen. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung der Basenpaare wurde als sehr hoch angegeben. *RNAfold* stellt die Faltungswahrscheinlichkeit jeder einzelnen Basenpaarung der Struktur in einer Farbskala dar (Anhang, Abb. 6.6 links).

Beide Programme zur Strukturvorhersage gaben für scr6925 die annähernd gleiche Struktur aus. Bei der von *RNAfold* getroffenen Vorhersage bestand die Struktur bereits aus sehr stabilen Basenpaarungen, ein Ergebnis, das von der zweiten Faltungssoftware bestätigt wurde (Anhang, Abb. 6.7). Die Kombination der beiden Strukturen ergab eine Sekundärfaltung aus drei Stammschleifen mit zwei zusätzlichen *internal loops*.

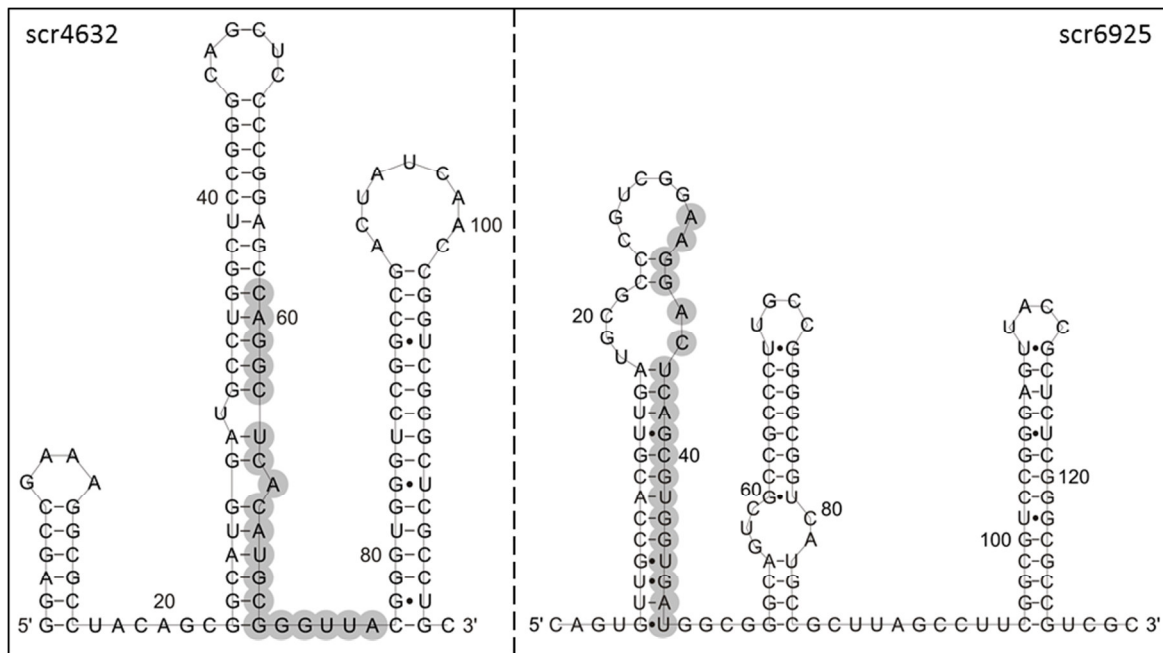


Abbildung 3.4: Faltungsvorhersage der sRNA scr4632 und scr6925

Die sRNA scr4632 bildete drei Stammschleifen aus, die in unterschiedlich großen terminalen *loops* enden. scr6925 bildete drei Stammschleifen, wovon zwei jeweils einen *internal loop* zeigten. Die Bindestelle der für die Northern Blot-Analysen genutzten Oligonukleotidsonden scr4632 und scr6925 ist in grau unterlegt.

Im Anhang unter Kapitel 6.3.1 sind die Sekundärstrukturvorhersagen aller weiteren bearbeiteten sRNAs abgebildet. Alle sRNAs bilden, je nach Länge der Sequenz, mindestens zwei typische Stammschleifen eingebettet in unterschiedliche Gesamtstrukturen. Das strukturelle Potential der sRNAs zur Regulation von RNA-Molekülen oder Proteinen ist gegeben.

3.3 Konservierung der sRNAs innerhalb der Gattung *Streptomyces*

Neben der Lage im Genom wurde auch die Konservierung der ausgewählten sieben sRNAs in der Gattung *Streptomyces* bioinformatisch überprüft [H1]. Die Konservierung der sRNAs wurde bei dieser Suche in insgesamt 43 Organismen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Konservierung der sRNAs in der Gattung *Streptomyces*

Stamm	scr2736	scr2952	scr3920	scr4115	scr4389	scr4632	scr6925
<i>S. albus</i> DSM 41398	X	X		X			X
<i>S. albus</i> J1074	X	X	X				
<i>S. albulus</i> NK660	X	X		X			X
<i>S. albulus</i> ZPM	X	X		X			X
<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	X	X	X	X	X		
<i>S. avermitilis</i> MA 4680	X	X	X	X	X		
<i>S. bingchenggensis</i> BCW 1	X	X	X	X			
<i>S. cattleya</i> DSM 46488		X	X				
<i>S. cattleya</i>		X	X				

NRRL 8057							
<i>S. clavuligerus</i>							
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. collinus</i> Tu 365	X	X	X	X	X		
<i>S. cyanogriseus</i> NMWT 1	X	X	X	X	X		
<i>S. davawensis</i> JCM 4913	X	X	X	X	X		X
<i>S. fulvissimus</i> DSM 49593	X	X		X			
<i>S. glaucescens</i> GLA.O	X	X	X	X	X		
<i>S. griseus</i> NBRC 13350	X	X		X			
<i>S. hygroscopicus</i> 5008	X	X	X	X	X		
<i>S. hygroscopicus</i> TL01	X	X	X	X	X		
<i>S. incarnatus</i> NRRL 8089	X	X	X	X	X		
<i>S. leeuwenhoekii</i> sleC34	X	X	X	X	X		X
<i>S. lividans</i> TK24	X	X	X	X	X		
<i>S. lydicus</i> A02	X	X		X			X
<i>S. nodosus</i> ATCC 14899	X	X	X	X	X		
<i>S. niveus</i>							
<i>S. pratensis</i> ATCC 33331	X	X	X				
<i>S. pristinaespiralis</i> HCCB 10218	X	X	X	X			
<i>S. rapamycinus</i> NRRL 5491	X	X	X	X			
<i>S. roseochromogenus</i>							
<i>S. scabiei</i> 87.22	X	X	X	X	X		X
<i>S. sp.</i> 769	X	X		X	X		
<i>S. sp.</i> CCM MD2014	X	X	X	X	X		X
<i>S. sp.</i> CFMR 7	X	X		X			X
<i>S. sp.</i> CNQ 509		X			X		
<i>S. sp.</i> Mg1	X	X	X	X	X		
<i>S. sp.</i> PAMC26508	X	X	X				
<i>S. sp.</i> PBH53	X	X	X	X	X		
<i>S. sp.</i> SirexAA-E	X	X	X				
<i>S. sviceps</i>							
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	X	X	X				
<i>S. vietnamensis</i> GIM4.0001	X	X	X				
<i>S. violaceusniger</i> Tu 4113	X	X	X	X			
<i>S. xiamenensis</i> 318		X					
	35	39	29	29	19	1	10

Die sRNA scr2952 ist am stärksten konserviert. Sie wurde in 39 Streptomyceten gefunden. scr2736 konnte in 35 Vertretern gefunden werden. Die sRNAs scr3920 und scr4115 wurden in 29 sowie scr4389 in 19 Organismen der Gattung *Streptomyces* ermittelt. Am geringsten konserviert sind die sRNAs scr6925 (10 Streptomyceten) und scr4632. Letztere wurde ausschließlich in *S. coelicolor* gefunden. Die Konservierung der einzelnen sRNA-Sequenzen sind im Anhang, Kapitel 6.3.2 zu finden.

Für die beiden sRNAs scr4632 und scr6925 konnte die bioinformatisch ermittelte Konservierung in einigen Spezies durch Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Die Stämme *S. aureofaciens*, *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. scabiei* und *S. venezuelae* wurden für 96 h in 3% TSB-Flüssigmedium angezogen, die RNA isoliert und ein Northern Blot angefertigt (Abb. 3.5).

Die experimentelle Expressionsanalyse von scr4632 ergab eine Übereinstimmung mit der bioinformatischen Suche. Die sRNA wurde ausschließlich in *S. coelicolor* nachgewiesen. Von scr6925 konnte die Expression in *S. aureofaciens*, *S. coelicolor* und *S. scabiei* bestätigt werden. In *S. lividans* wurde eine sehr schwache Expression ermittelt. In *S. venezuelae* wurde sie nicht exprimiert.

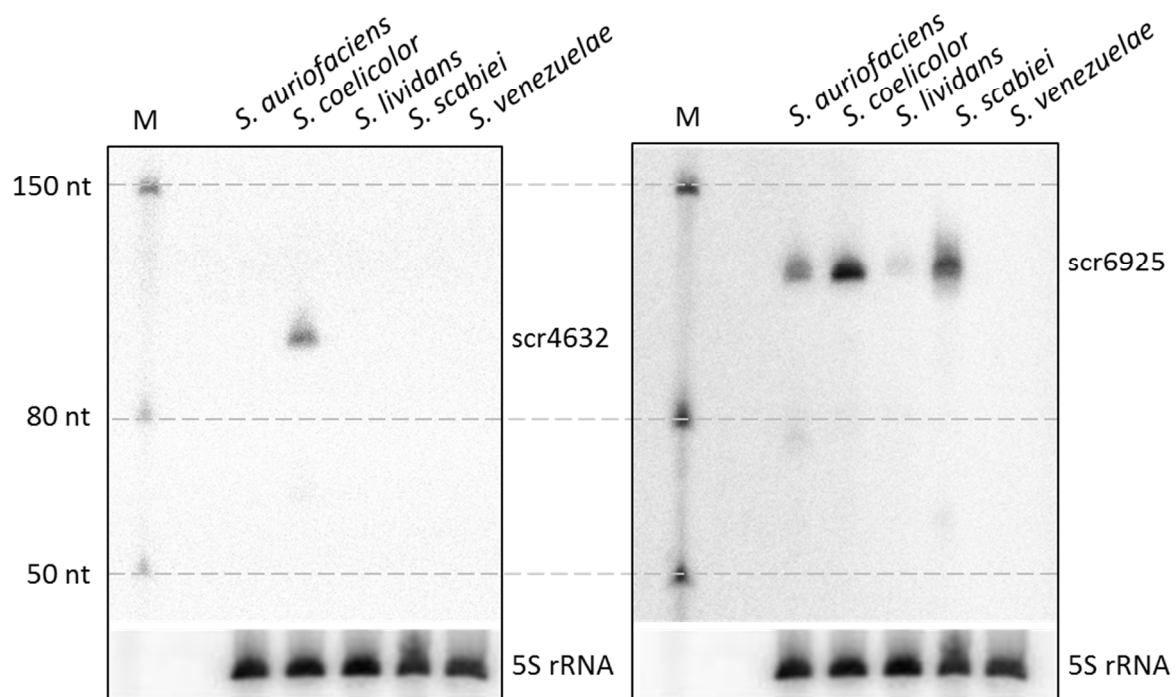


Abbildung 3.5: Northern Blot zur Expressionsanalyse von scr4632 und scr6925 in verschiedenen Streptomyceten

Die Expression der beiden sRNAs wurde in den Streptomyceten-Arten *S. aureofaciens*, *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. scabiei* und *S. venezuelae* überprüft. Als Marker (M) diente die Low Range ssRNA Leiter (peqlab). scr4632 ergab nur in *S. coelicolor* ein Signal, scr6925 in allen Arten außer *S. venezuelae*.

3.4 Expressionsanalyse in *S. coelicolor*

Alle zur Bearbeitung ausgewählten sRNAs zeigten eine wuchsphasenabhängige, detektierbare Expression in 3% TSB-Flüssigmedium. (Vockenhuber *et al.*, 2011) Um die Funktion dieser sRNAs zu ermitteln, sollte ein genaueres Bild ihrer Expression erstellt werden.

3.4.1 Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 unter Stressbedingungen

sRNAs sind häufig in die Regulation von Wachstumsphasen oder Stressbedingungen involviert. Daher wurde zunächst der Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression der sRNAs überprüft. (Gottesman, 2005; Repoila & Darfeuille, 2009; Storz *et al.*, 2005)

Der Wildtyp von *S. coelicolor* wurde in 3% TSB-Medium angezogen, da die Zellen in diesem Vollmedium besonders gut und dicht anwachsen. Anschließend wurden sie verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt und nach 96 h bei 28°C, nach Erreichen der Stationärphase, geerntet. Als Stressbedingungen wurden Kältestress, Hitzestress, Sauerstoffmangel, osmotischer Stress und UV-Bestrahlung gewählt. (Vockenhuber & Suess, 2012) Die Kulturen wurden hierzu für 95 h angezogen und vor der RNA-Isolierung für 1 h der Stressbedingung ausgesetzt. Die UV-Bestrahlung bei 254 nm wurde nur für 1 min durchgeführt. Die Zellen wurden dem Temperaturstress ausgesetzt, indem sie im Kühlschrank (4°C) bzw. im Inkubationsschrank (42°C) für 1 h inkubiert wurden. Hierzu wurde der Kultur ein steriler Rührfisch zugefügt und die Kulturen für die Sauerstoffversorgung auf einem Magnetprüher langsam gerührt. Für die Applikation des Sauerstoffmangels wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde im Inkubator bei 28°C ohne Schütteln weiter inkubiert. Osmotischer Stress wurde über die Zugabe von 10 mM KCl zur Kultur ausgelöst. Die Kultur wurde dafür abzentrifugiert, in frischem TSB-Medium resuspendiert und die entsprechende Menge 1M KCl Stocklösung zugefügt, anschließend wurde ebenfalls für eine weitere Stunde bei 28°C, schüttelnd, inkubiert. Da UV-Licht Zellen schnell und intensiv schädigen kann, wurde die Zeitspanne dieser Stressbedingung auf 1 min gekürzt. Die Kultur wurde in eine sterile Petrischale, 12 cm Durchmesser, überführt und für 1 min auf dem UV-Schirm stehend mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Unmittelbar im Anschluss an die Applikation des jeweiligen Stressparameters wurden die Kulturen geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit der aus den Kulturen isolierten RNA wurden Northern Blots angefertigt. Sie sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Alle gezeigten Northern Blot-Analysen wurden mindestens zwei Mal mit RNA von unabhängig voneinander angezogenen Kulturen wiederholt.

Die angewendeten Stressbedingungen zeigten bei der sRNA scr4632 keinen Effekt. Die sRNA scr6925 zeigte eine erhöhte Expression bei angewendetem Temperaturstress (4°C und 42°C). Dies ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Eine leichte, aber variable Reduktion der Expression zeigte sich bei Sauerstoffmangel für scr6925. Die Quantifizierung der Expression des Northern Blots ist Abbildung 3.6 zu entnehmen.

Es konnte keine Stressbedingung determiniert werden, deren Einfluss sich signifikant auf die sRNA-Expression auswirkte. Dies zeigte sich in der Standardabweichung. Es ist möglich, dass die Stressparameter sich zwar als Stress auf die Zellen auswirkten, jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit den hier überprüften sRNAs als potentielle Stressregulatoren stehen.

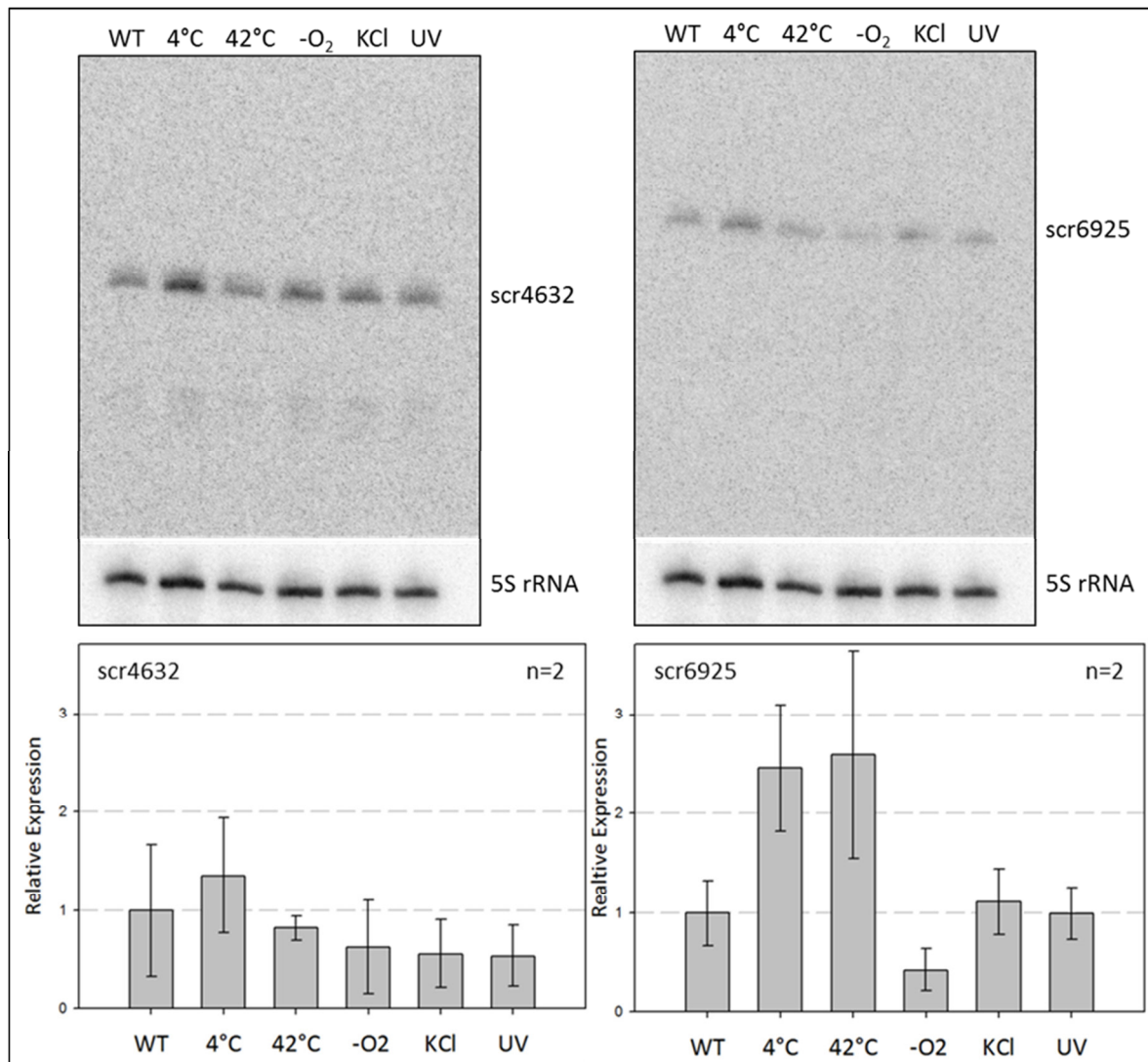


Abbildung 3.6: Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 unter verschiedenen Stressbedingungen

Oben Der Northern Blot wurde mit Wildtyp-RNA angefertigt, die aus Kulturen isoliert wurde, welche zuvor verschiedenen Stressbedingungen (Kälte: 4°C; Hitze: 42°C; Sauerstoffmangel: -O₂; osmotischer Stress: 10 mM KCl; UV-Stress: UV 254 nm) ausgesetzt waren. **Unten** Quantifizierung der Expression der oben gezeigten Northern Blots.

3.4.2 Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in verschiedenen Stickstoffquellen

Stickstoff spielt für die Synthese von Aminosäuren eine wichtige Rolle im vielschichtigen Stoffwechsel von *S. coelicolor* und ist zudem für die Bildung von Sekundärmetaboliten entscheidend. Der Stickstoff-Stoffwechsel ist sehr komplex und ermöglicht es den Zellen sensitiv auf die vorliegenden Nährstoffe zu reagieren und unterschiedliche Quellen zu nutzen. (Fisher & Wray, 1989) Der Lebensraum von *S. coelicolor* ist in der Regel kohlenstoffreich, aber phosphat- und stickstoffarm. Der Organismus muss deshalb in der Lage sein, auch kleine Mengen der nötigen Nährstoffe effizient aufzunehmen. (Hodgson, 2000)

In vorangegangenen Experimenten konnte bei der Anzucht in Stickstoff-limitiertem Medium eine starke Reduktion der Expression von scr4632 festgestellt werden. Dies könnte auf eine

Stickstoffabhängigkeit dieser sRNA hindeuten. Daher wurde der Einfluss verschiedener Stickstoffverbindungen auf die Expression der sRNAs analysiert.

3.4.2.1 Casaminosäuren, Glutamin, Glutamat

Die Aminosäuren Glutamin und Glutamat spielen eine zentrale Rolle in der Stickstoffassimilation. In *S. coelicolor* wird bei einer Stickstoffmangel-Situation das zur Verfügung stehende Ammonium in einer mehrstufigen Reaktion unter Energieverbrauch zu zwei Glutamat-Molekülen umgesetzt. Bei Stickstoffüberschuss wird Ammonium zusammen mit α -Ketoglutarat zu Glutamat umgewandelt. (Reuther, 2008) Neben der Fixierung von Ammonium können auch Aminosäuren als Stickstoffquelle genutzt werden. Sie sind ebenfalls in nur geringer Konzentration im Bodensubstrat enthalten, was deren Synthese umso wichtiger macht. Streptomyceten verzichten deshalb so gut wie ganz auf hemmende Regulationsmechanismen der Aminosäure-Synthesewege. Zudem verfügen sie über konstitutive Mechanismen der Aminosäure-Synthese. (Hodgson, 2000; Hood *et al.*, 1992)

Der Einfluss der wichtigen Intermediate der Stickstofffixierung von *S. coelicolor*, Glutamin (Q) und Glutamat (E) sowie die Wirkung der Zugabe einer Vielzahl von verschiedenen Aminosäuren in Form der Casaminosäuren (CAA) wurde in diesem Versuchsansatz überprüft. CAA wurde dem Medium, ebenso wie Glutamat in 1% Endkonzentration zugefügt. Glutamin wurde nur in 0,5% Endkonzentration zugegeben, da es über zwei Aminogruppen verfügt und somit die doppelte Menge Stickstoff im Vergleich mit Glutamat enthält. Die zu überprüfenden Stickstoffquellen wurden Evans Minimalmedium hinzugefügt, Evans Minimalmedium ohne Zusatz (Ev) diente als Kontrolle (Abb. 3.7).

Nur bei Zugabe von CAA zeigte scr4632 eine Reduzierung der Expression. Auch die Expression von scr6925 verringerte sich bei Zugabe von CAA. Die Reduzierung des Signals war noch stärker als bei scr4632. Die Expression von scr6925 nahm in Gegenwart von Glutamin drastisch ab, während die Zugabe von Glutamat bei beiden sRNAs keine Veränderung bewirkte. Die Quantifizierung der Northern Blot-Signale beider sRNAs ist in Abbildung 3.7 aufgeführt.

Der Expressionsabfall von scr4632 und scr6925 bei Anzucht unter Zugabe von CAA konnte reproduziert werden. Die Reduzierung der Expression durch die Zugabe von Glutamin zum Medium ließ sich nur für scr6925 reproduzieren.

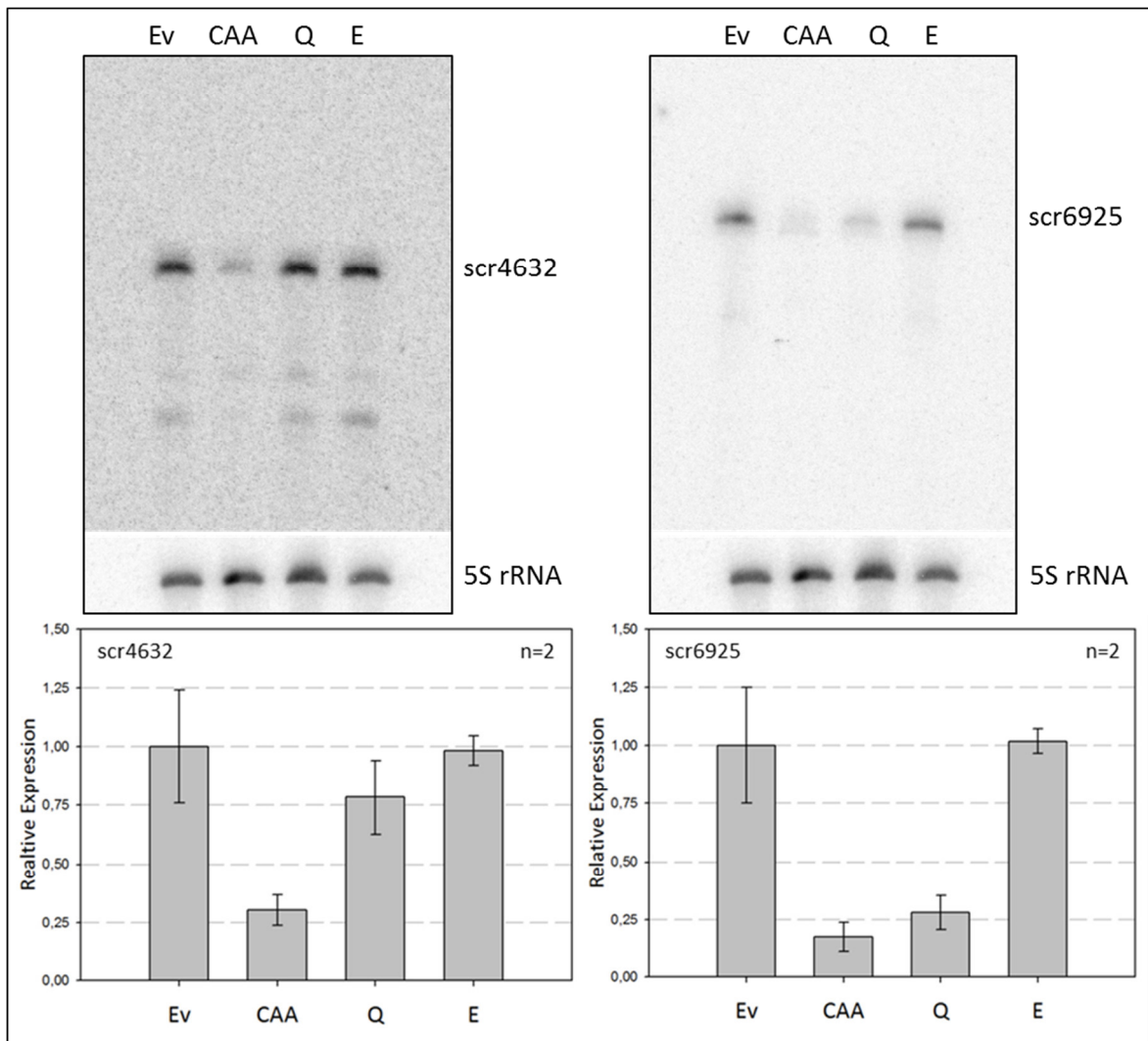


Abbildung 3.7: Analyse der Expression von *scr4632* und *scr6925* in Evans Minimalmedium mit verschiedenen zugesetzten Aminosäuren im Wildtyp von *S. coelicolor*

Oben Dem Evans Minimalmedium wurden Casamino acids (CAA), Glutamin (Q) und Glutamat (E) zugefügt. Eine Kontrolle mit Evans Minimalmedium ohne Zusatz (Ev) wurde ebenfalls angezogen. **Unten** Quantifizierung der Expression des oben gezeigten Northern Blots.

3.4.2.2 Tryptophan, Harnstoff und Ammoniumchlorid

Zu den von *S. coelicolor* verwerteten Stickstoffquellen zählt neben Harnstoff auch Ammonium. (Basarán *et al.*, 1989; Flores, 1996; Nitsch & Kutzner, 1968) Für diese Northern Blot-Analyse wurde dem Evans Minimalmedium 50 mM Harnstoff (H) bzw. 100 mM Ammoniumchlorid (A) zugesetzt. Die Konzentrationen der Zusätze wurden so gewählt, dass die Stickstoffmenge gleich groß war. Da Harnstoff über zwei Stickstoffatome verfügt und Ammoniumchlorid nur über eines, wurde hier die doppelte Menge verwendet. Die Stickstoffquelle von Evans Minimalmedium (Natriumnitrat) wurde für diese Anzuchtreihe nicht zugegeben, sondern durch die alternativen Stickstoffquellen ersetzt.

Tryptophan (T) war nicht in den vorhergehend überprüften CAA enthalten, weshalb dessen Wirkung auf die sRNA-Expression als aromatische, stickstoffhaltige Aminosäure ebenfalls analysiert und dem Medium in einer Endkonzentration von 0,4% hinzugefügt wurde. Die Konzentration von Tryptophan musste im Hinblick auf dessen Löslichkeitsgrenze so gewählt

werden. Als Kontrolle wurde eine Kultur Evans Minimalmedium ohne Zusätze mitgeführt (Ev). Der Northern Blot ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

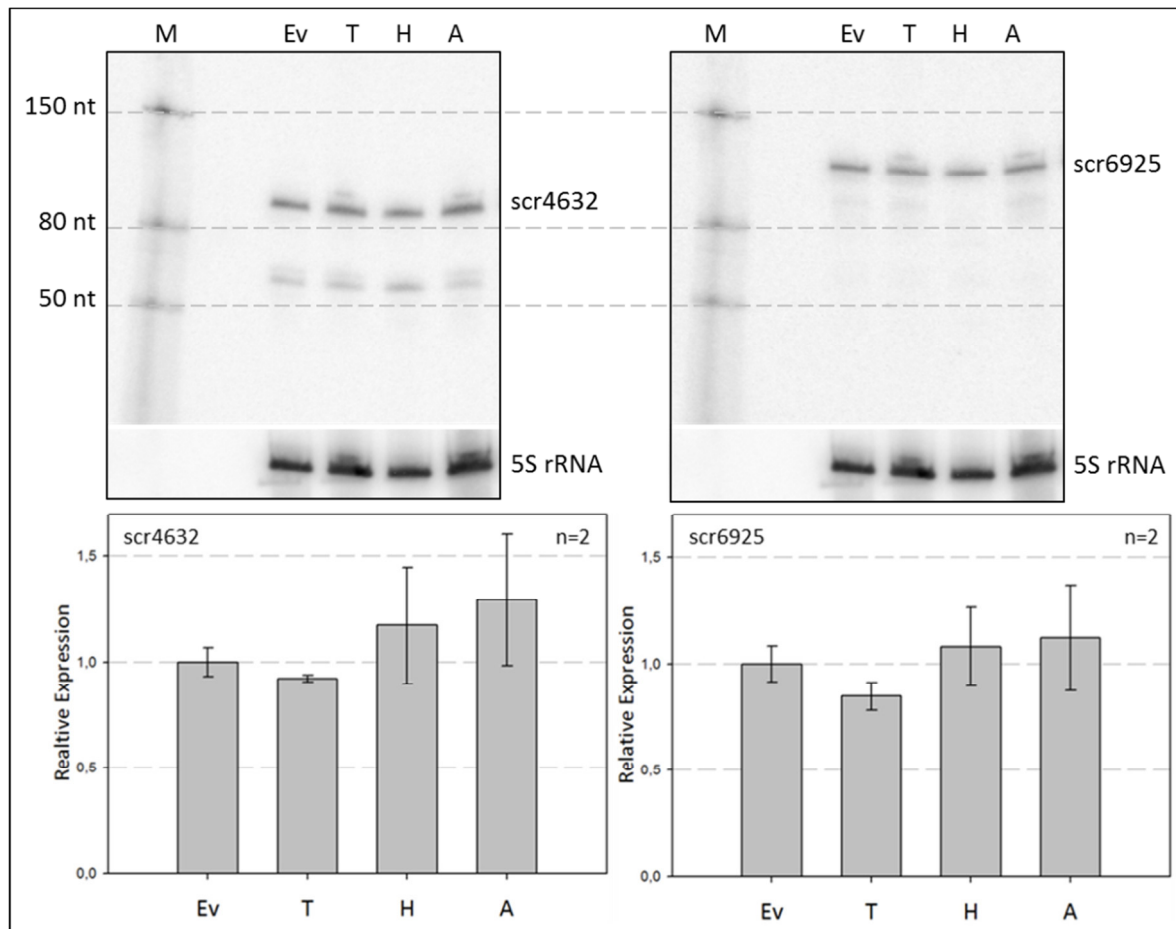


Abbildung 3.8: Northern Blot-Analyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in Evans Minimalmedium mit verschiedenen Zusätzen im Wildtyp von *S. coelicolor*

Oben Dem Evans Minimalmedium wurden 0,4% Tryptophan (T), 50 mM Harnstoff (H) und 100 mM Ammoniumchlorid (A) zugefügt. Eine Kontrolle bestehend aus Evans Minimalmedium ohne Zusatz (Ev) wurde mitgeführt. Die Low Range ssRNA Leiter von peqlab diente als Marker (M). **Unten** Quantifizierung der Expression des oben gezeigten Northern Blots.

Für beide sRNAs zeigte sich keine Veränderung der Expression in Abhängigkeit von den getesteten Stickstoffquellen. Auch hier zeigte die sRNA scr4632 das typische kleinere Transkript, dessen Expressionsmuster sich bei den verschiedenen Zusätzen nicht änderte. Die Quantifizierung des Northern Blots ist Abbildung 3.8 zu entnehmen.

3.4.2.3 Methionin

Zusätzlich zu seiner Schlüsselrolle bei der Translationsinitiation ist Methionin die Vorstufe von S-Adenosylmethionin, welches als Cofaktor im Nucleotid- und Aminosäure-Stoffwechsel eine Rolle spielt. (Ferla & Patrick, 2014; Grillo & Colombatto, 2005) Daher sollte die Expression der sRNAs in *S. coelicolor*-Wildtypkulturen auch in verschiedenen Methionin-Konzentrationen untersucht werden.

Methionin wurde den Evans Minimalmedien-Kulturen in Endkonzentrationen von 0%, 0,5%, 1% und 2% zugegeben, die darin für 72 h bei 28°C angezogen wurden. Die Expression zeigte in der

anschließenden Northern Blot-Analyse für beide sRNAs bei 1% und 2% einen leichten Rückgang der Expression. Allerdings zeigte die Quantifizierung dieser Kulturen auch eine große Abweichung des Expressionslevels (Abb. 3.9).

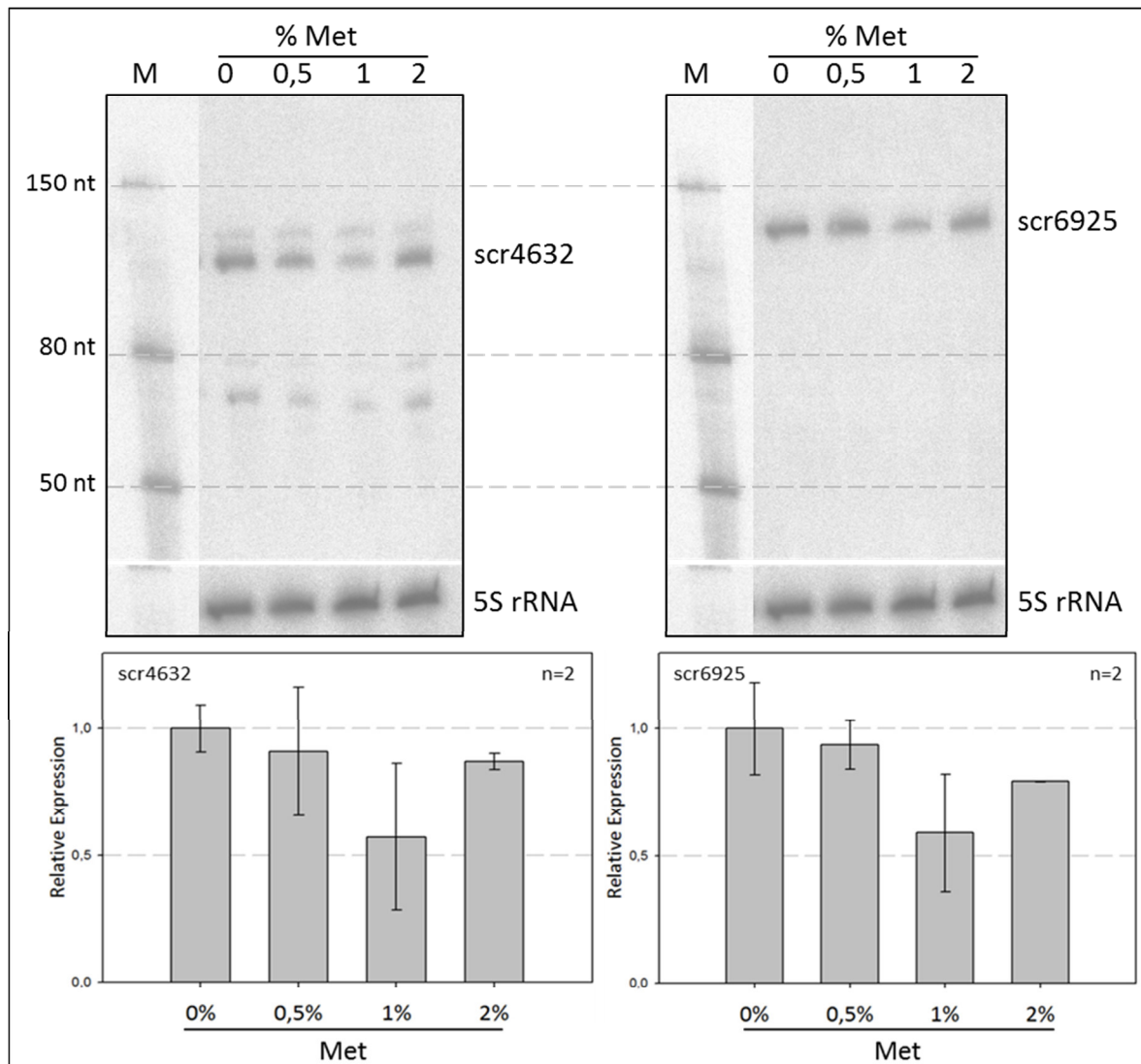


Abbildung 3.9: Northern Blot-Analyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in mit Methionin versetztem Evans Minimalmedium

Oben Kulturen des *S. coelicolor* Wildtyps wurden in Evans Minimalmedium ohne Zusatz von Methionin (0) und mit 0,5%, 1% und 2% zugesetztem Methionin angezogen. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Unten** Quantifizierung der Expression des oben gezeigten Northern Blots.

3.4.2.4 Cystein

Streptomyceten besitzen die bislang nur in eukaryotischen Zellen vermuteten Enzyme des Trans-Sulfonierungsweges. Mit diesen kann Schwefel zwischen Methionin und Cystein hin und zurück übertragen werden, was für den Synthese-Kreislauf zur Herstellung des wichtigen Methylgruppen-Überträgers S-Adenosylmethionin einen großen Vorteil darstellt. (Hodgson, 2000; Kern & Inamine, 1981) Neben der bereits überprüften Wirkung von Methionin auf die Expression der sRNAs sollte daher nun auch die Wirkung von Cystein untersucht werden.

Evans Minimalmedium wurde mit Endkonzentrationen von 0%, 0,25% und 0,5% Cystein supplementiert und mit der nach 96 h bei 28°C isolierten RNA ein Northern Blot angefertigt (Abb. 3.10).

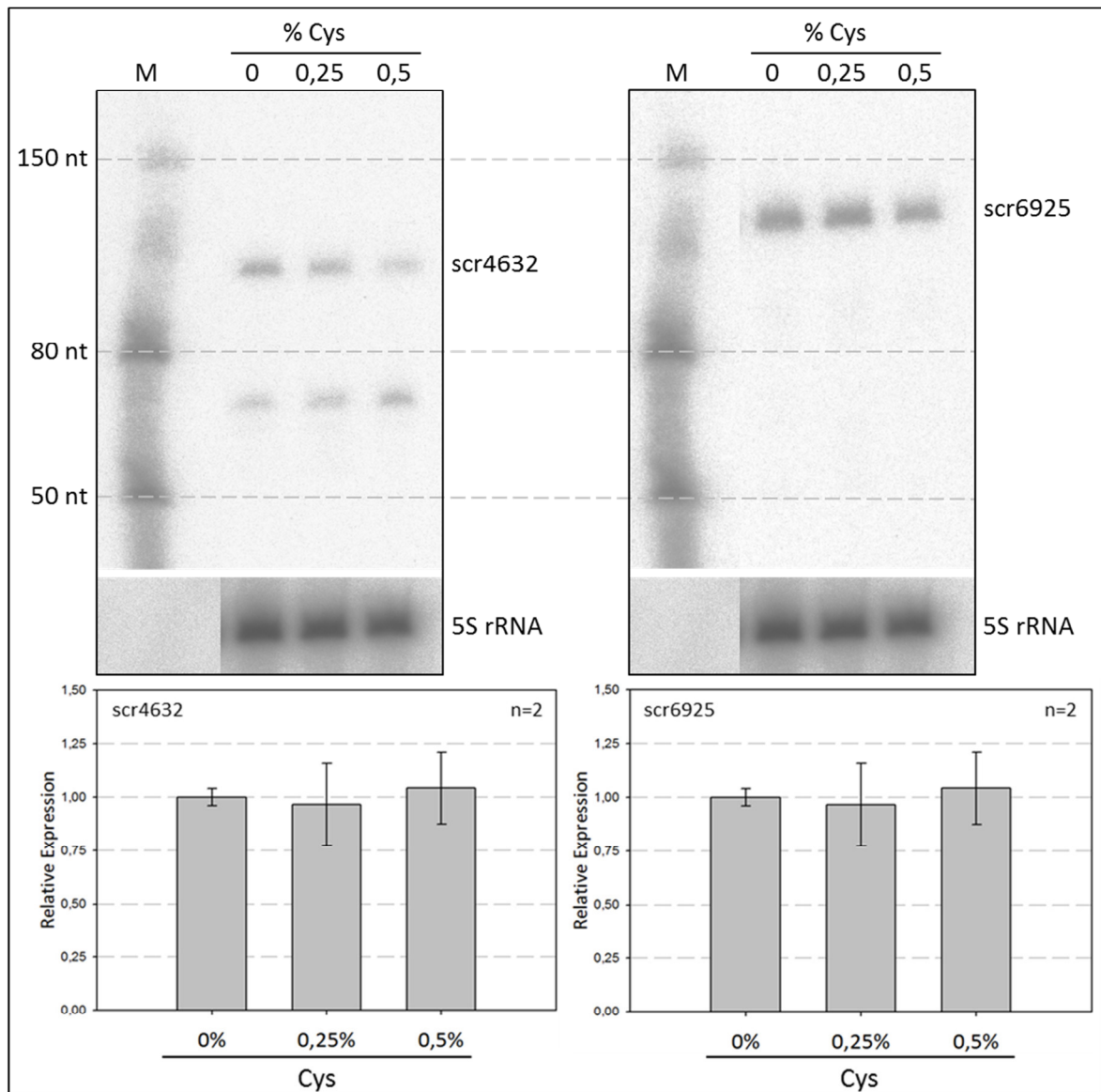


Abbildung 3.10: Expression der sRNAs scr4632 und scr6925 in Cystein-haltigem Evans Minimalmedium unterschiedlicher Konzentration

Oben Der Wildtyp von *S. coelicolor* wurde in Evans Minimalmedium angezogen, dem verschiedene Cystein-Konzentrationen (0%, 0,25%, 0,5%) zugesetzt waren. Als Marker für den Northern Blot wurde die Low Range ssRNA Leiter (M) verwendet. **Unten** Quantifizierung der Expression des oben gezeigten Northern Blots.

Die Expression der sRNA scr4632 zeigt mit steigender Konzentration einen leichten Rückgang der oberen Transkriptbande bei 118 nt. Die in Cystein-haltigem Medium angezogenen Zellen wuchsen vergleichbar schlecht in Bezug auf das Medium ohne Cystein. Die Zellen wurden in gleicher Zeit nicht so dicht und die Zellaggregate waren insgesamt kleiner. Die Expression der sRNA scr6925 veränderte sich durch Zugabe der Aminosäure nicht. Die Quantifizierung des Northern Blots ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

3.4.2.5 Lysin

Lysin spielt in Streptomyceten eine wichtige Rolle bei der Synthese von Sekundärmetaboliten wie z.B. den β -Lactamen. (Hodgson, 2000; Mendelovitz & Aharonowitz, 1983) *S. coelicolor* produziert fünf verschiedene Antibiotika. Daher sollte überprüft werden, ob eine der sRNAs vielleicht mit der Antibiotikasyntese in Verbindung steht.

Der Wildtyp von *S. coelicolor* wurde in Evans Minimalmedium angezogen, welchem mit einer Endkonzentration von 0%, 0,5%, 1% bzw. 2% Lysin zugefügt worden war. Der Northern Blot und die Quantifizierung sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

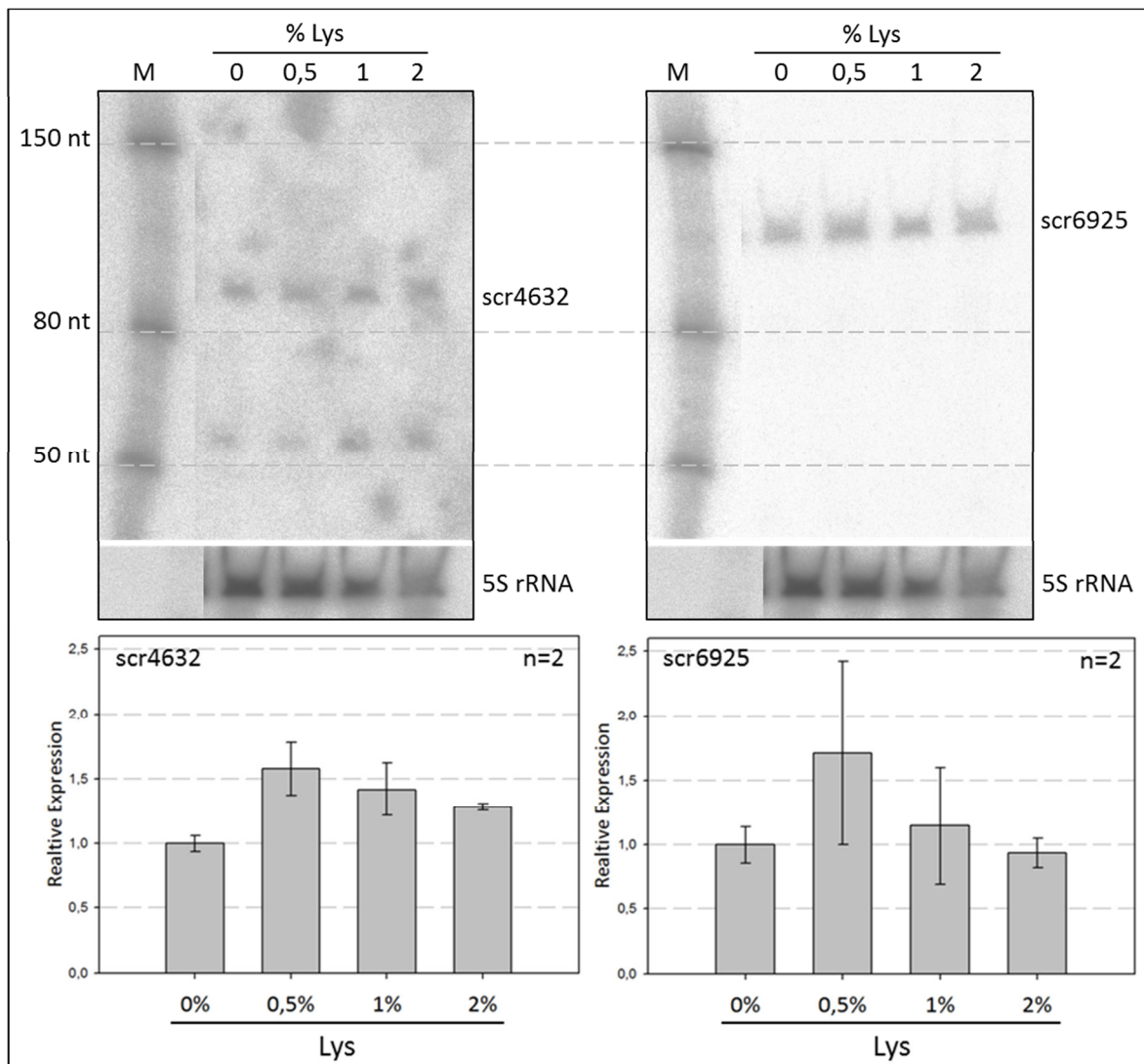


Abbildung 3.11: Analyse der Expression von *scr4632* und *scr6925* in mit Lysin versetztem Evans Minimalmedium

Oben Der Wildtyp von *S. coelicolor* wurde in Evans Minimalmedium mit verschiedenen Lysin-Konzentrationen (0%, 0,5%, 1%, 2% Endkonzentration) angezogen. Die Low Range ssRNA Leiter von peqlab wurde als Marker (M) verwendet. **Unten** Quantifizierung der Expression des oben gezeigten Northern Blots.

Die Zugabe dieser Aminosäure führte weder bei *scr4632* noch bei *scr6925* zu einer Änderung der Expression. Der fleckige Hintergrund ist auf die Hybridisierungslösung zurückzuführen.

3.4.2.6 Zusammenfassung Expressionsanalyse in Flüssigkultur

Die Auswertung der Northern Blot-Analysen war schwierig, da alle Messungen durch hohe Standardabweichungen charakterisiert waren.

sRNAs in Bakterien werden immer wieder der Regulation von Stressantworten zugeordnet. Dennoch reagierte die sRNA scr4632 auf keine der verschiedenen Stressbedingungen, denen die Zellen ausgesetzt waren. Die sRNA scr6925 reagierte mit einer erhöhten Expression auf Temperaturstress von 4°C sowie 42°C und auf Sauerstoffmangel. Die induzierten Effekte lagen jedoch nur bei einer etwa 2fachen Expressionsänderung, weshalb hier keine weiteren Untersuchungen folgten. Zudem ergab sich eine zu große Schwankung für die Expression der sRNAs unter den beobachteten Bedingungen (Abb. 3.6).

Vielversprechender zeigten sich die Ergebnisse der Expressionsanalyse bei variierten Nährstoffbedingungen. Die Zugabe von Harnstoff und Ammoniumchlorid sowie der Aminosäuren Tryptophan, Glutamat, Methionin und Cystein konnte keine signifikante Expressionsänderung der beiden untersuchten sRNAs induzieren (Abb. 3.8-3.10). Die Supplementierung des Mediums mit Lysin in Endkonzentrationen von 0,5% und 1% führte bei beiden sRNAs zu einer leichten Erhöhung der Expression, bei scr6925 etwas mehr als bei scr4632. Doch auch hier kam es zu sehr großen Schwankungen des Expressionslevels (Abb. 3.11).

Die deutlichsten Expressionsänderungen, hier mit nur geringer Standardabweichung, konnten bei scr4632 und scr6925 durch Zugabe von Casaminoäuren zum Medium erreicht werden (Abb. 3.7). Die Expression beider sRNAs verringerte sich auf nur noch $\frac{1}{4}$ der Expression der Kulturen ohne die Zugabe von Casaminoäuren. Ein vergleichbarer Effekt wurde für scr6925 auch durch die Zugabe von Glutamin zum Medium erreicht. Hier sank das Expressionslevel auf $\frac{1}{4}$ verglichen mit der Kontrolle ohne zugesetzte Casaminoäuren. Die Stärke der Expressionsänderung und deren gute Reproduzierbarkeit weisen darauf hin, dass die untersuchten sRNAs eher an der Regulation von Prozessen der Nährstoffassimilation und nicht an der Reaktion auf Stresssituationen beteiligt sind.

In vorangegangenen Untersuchungen war auch die Wirkung von phosphatlimitiertem Medium auf das Expressionslevel der sRNAs getestet worden. Es ergaben sich jedoch keinerlei Veränderungen der Expression, weshalb diese Bedingung nicht weiter getestet wurde. Kohlenstoffverbindungen werden in einem späteren Kapitel behandelt.

3.5 Analyse der sRNAs mittels Überexpressions- und Deletionsmutanten

Zur Analyse der Funktion einer sRNA wird oft eine Veränderung der Kopienanzahl der zu untersuchenden Transkripte herangezogen. In Organismen mit fein abgestimmten biologischen Abläufen, kann die Manipulation der Transkriptmenge durch Überexpression oder Deletion einer bestimmten Sequenz die regulierten Prozesse stören. Dies kann einen Phänotyp induzieren, welcher die Aufklärung der ausgeführten Funktion oder des betroffenen Mechanismus ermöglicht. (Prelich, 2012) Daher sollten die sRNA-Sequenzen in *S. coelicolor* überexprimiert bzw. aus dessen Genom deletiert werden. Die Herstellung von zur Überexpressions- und Deletionsmutanten wurden für die sRNAs scr2736, scr2952, scr3920, scr4115, scr4389, scr4632 und scr6925 durchgeführt.

3.5.1 Herstellung der Überexpressionsmutanten

Zur Überexpression der sRNA-Sequenzen in *S. coelicolor* wurden die Sequenzen der Transkripte unter die Kontrolle des starken, konstitutiven Phagen-Promotors SF14 gebracht und plasmidständig exprimiert. (Labes *et al.*, 1997) Für die Überexpressionsstudien wurde das Plasmid pGMsT (M. Vockenhuber, Darmstadt) gewählt. Es ist 5369 bp groß und trägt als Selektionsmarker eine Apramycinresistenz (*aac(3)IV*). Zudem besitzt es einen *origin of transfer* (*oriT*), der zur Konjugation von *E. coli* in *S. coelicolor* benötigt wird. Des Weiteren hat das Plasmid sowohl einen ColE1 *origin* für die Replikation in *E. coli*, wie auch Replikationsproteine (*rep*, *SSO*) für die Replikation in Streptomyceten (Abb. 3.12).

Die sRNA-Sequenz wurde mit zusätzlichen 100 bp *downstream* der sRNA hinter den SF14-Promotor inseriert. Dies sollte eine Termination über die natürliche Terminatorstruktur der sRNA gewährleisten. Um ein Weiterlesen über das Rückgrat des Plasmids zu verhindern, befindet sich auf dem Plasmid hinter der Insertionsstelle ein zusätzlicher synthetischer Terminator.

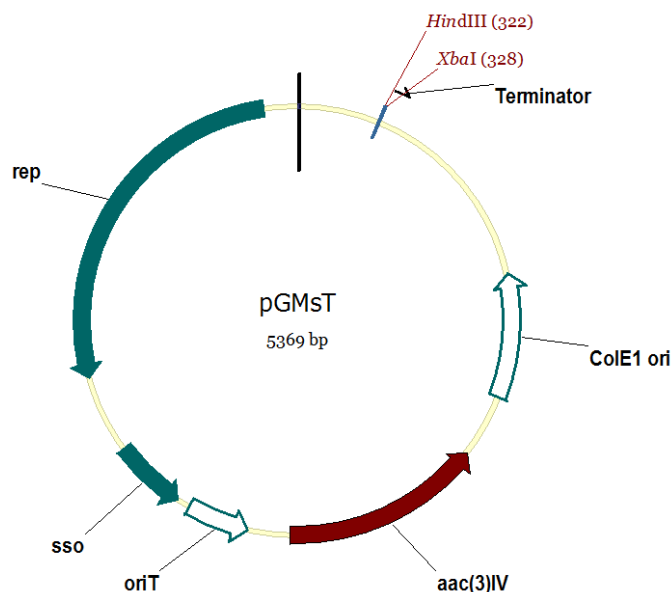


Abbildung 3.12: Plasmidkarte des Plasmids pGMsT zur Erstellung der Überexpressionsmutanten

pGMsT trägt den zur Konjugation aus *E. coli* in Streptomyceten notwendigen *oriT*, zudem den zur Replikation in *E. coli* nötigen ColE1 *origin*. Die Replikation in Streptomyceten wird durch die Proteine *rep* und *SSO* vermittelt. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid eine Apramycinresistenz (*aac(3)IV*). Die synthetische Terminatorstruktur soll sicherstellen, dass die in die *multiple cloning site* eingefügten Transkripte korrekt terminieren. Die für die Erstellung der Überexpressionsmutanten verwendeten Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* sind eingezeichnet.

Der SF14-Promotor wurde mit den Oligonukleotiden 4oe_1 und 2oe_1 von dem Plasmid pGM1190 (Diplomarbeit, Nona Heueis) als *template* amplifiziert. Die sRNA-Sequenz mit zusätzlichen 100 bp *downstream* wurde mit den Oligonukleotiden 2oe_2 und 2oe_3 von genomischer DNA amplifiziert. Die Oligonukleotidsequenz von 2oe_1 war komplementär zu den letzten 20 bp der Sequenz des SF14-Promotors. Zusätzlich hängte 2oe_1 die ersten 20 bp des 5'-Endes der sRNA-Sequenz an das DNA-Fragment an. Das Oligonukleotid 2oe_2 führte die letzten 20 bp der 3'-Sequenz des SF14-Promotors mit und war zu den ersten 20 bp der sRNA-Sequenz komplementär. Diese 20 bp große Überlappung machte es möglich, die Produkte der einzelnen PCR-Reaktionen mittels *overlap*-PCR zu einer verbundenen Sequenz zusammenzufügen. Die

außenliegenden Oligonukleotide 4oe_1 und 2oe_3 führten mit der Sequenz des Oligonukleotids die Restriktionsschnittstellen HindIII und XbaI für die Insertion in das pGMsT-Plasmid ein. Das Schema ist Abbildung 3.13 zu entnehmen.

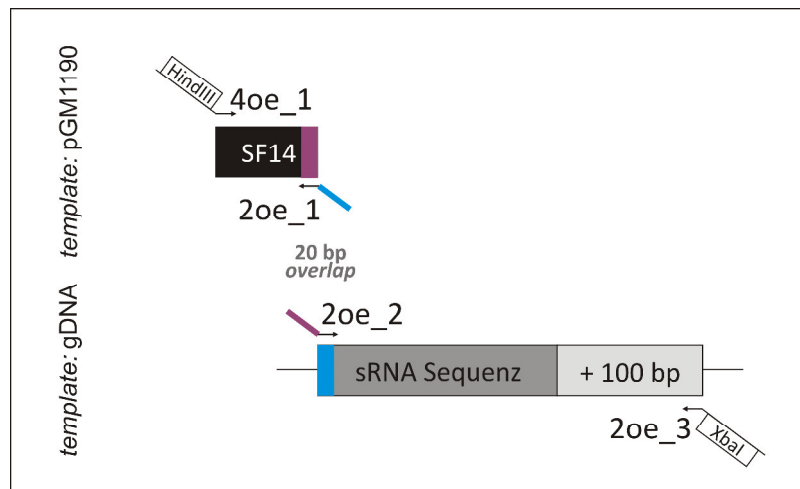


Abbildung 3.13: Strategie zu Herstellung der Überexpressionsplasmide

Der SF14-Promotor und die sRNA-Sequenz mit zusätzlichen 100 bp *downstream*-Sequenz wurden in einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Anschließend folgte eine *overlap*-PCR, um beide Amplifikate zu vereinen. Die mit den Oligonukleotiden eingeführten Restriktionsschnittstellen bzw. die komplementären Bereiche für die *overlap*-PCR (rot und blau) sind eingezeichnet.

Nachdem die *overlap*-PCR abgeschlossen war, wurde sowohl das PCR-Produkt als auch das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen HindIII-HF und XbaI verdaut, aufgereinigt und anschließend ligiert. Die Insertion wurde mittels Sequenzierung überprüft und das fertige Überexpressionsplasmid (Abb. 3.14) über *E. coli* ET12567/pUZ8002 in *S. coelicolor* konjugiert.

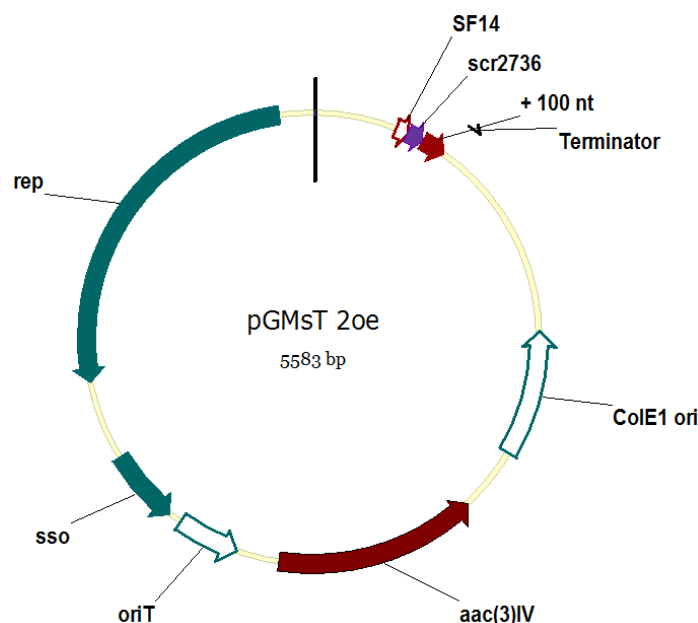


Abbildung 3.14: Plasmidkarte des Plasmids zur Überexpression der sRNA scr2736

In das Plasmid pGMsT (Abbildung 3.12) wurden der SF14-Promotor, die Sequenz der sRNA und zusätzliche 100 bp *downstream*-Sequenz der sRNA inseriert.

Die zur Herstellung der Überexpressionsplasmide der sRNAs scr2736, scr2952, scr3920, scr4115 und scr4389 verwendeten Oligonukleotide der einzelnen PCR-Schritte sind Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Herstellung der Überexpressionsplasmide der sRNAs scr2736, scr2952, scr3920, scr4115 und scr4389

sRNA	Abkürzung	PCR-Schritt	Oligo-nukleotid	template
scr2736	2oe	SF14-Promotor	4oe_1	pGM1190_4632oe
			2oe_1	
		sRNA-Sequenz + 100 bp	2oe_2	genomische DNA
			2oe_3	
		overlap-PCR	4oe_1	PCR- Produkte: SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp
			2oe_3	
scr2952	29oe	SF14-Promotor	4oe_1	pGM1190_4632oe
			29oe_1	
		sRNA-Sequenz + 100 bp	29oe_2	genomische DNA
			29oe_3	
		overlap-PCR	4oe_1	PCR- Produkte: SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp
			29oe_3	
scr3920	3oe	SF14-Promotor	4oe_1	pGM1190_4632oe
			3oe_1	
		sRNA-Sequenz + 100 bp	3oe_2	genomische DNA
			3oe_3	
		overlap-PCR	4oe_1	PCR- Produkte: SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp
			3oe_3	
scr4115	41oe	SF14-Promotor	4oe_1	pGM1190_4632oe
			41oe_1	
		sRNA-Sequenz + 100 bp	41oe_2	genomische DNA
			41oe_3	
		overlap-PCR	4oe_1	PCR- Produkte: SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp
			41oe_3	
scr4389	43oe	SF14-Promotor	4oe_1	pGM1190_4632oe
			43oe_1	
		sRNA-Sequenz + 100 bp	43oe_2	genomische DNA
			43oe_3	
		overlap-PCR	4oe_1	PCR- Produkte: SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp
			43oe_3	

Die Überexpressionssequenzen für scr4632 und scr6925, bestehend aus SF14-Promotor, sRNA-Sequenz und zusätzlichen 100 bp *downstream*-Sequenz der sRNA, konnten über eine einzelne PCR-Reaktion von den Plasmiden pGM1190_4632oe bzw. pGM1190_6925oe amplifiziert werden. Die Plasmide lagen bereits fertig aus einer früheren Arbeit vor (Diplomarbeit, Nona Heueis). Das pGM1190-Plasmid gleicht im Wesentlichen dem verwendeten pGMsT (pGM1190-short-

terminator). Es war jedoch deutlich größer und besaß unnötige Eigenschaften, wie z.B. eine Thiostreptonresistenz. pGM1190 wurde deshalb verkleinert und mit einer zusätzlichen Terminatorstruktur versehen (M. Vockenhuber, Darmstadt). Die Überexpressionskassette wurde mit den Oligonukleotiden 4oe_1 und 4oe_2 bzw. 6oe_1 und 6oe_2 amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide und *templates* sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Die über PCR amplifizierte DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI verdaut und in pGMsT ligiert.

Tabelle 3.3: Herstellung der Überexpressionsplasmide der sRNAs scr4632 und scr6925

sRNA	Abkürzung	PCR-Schritt	Oligo-nukleotid	template
scr4632	4oe	SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp	4oe_1	pGM1190_4632oe
			4oe_2	
scr6925	6oe	SF14-Promotor und sRNA-Sequenz + 100 bp	4oe_1	pGM1190_6925oe
			6oe_2	

3.5.2 Herstellung der Deletionsmutanten

3.5.2.1 Deletion durch homologe Rekombination

Die Deletion der sRNA-Sequenzen aus dem Genom von *S. coelicolor* sollte mittels homologer Rekombination erreicht werden. Hierbei wird die sRNA-Sequenz chromosomal durch ein Resistenzgen ersetzt (Abb. 3.15).

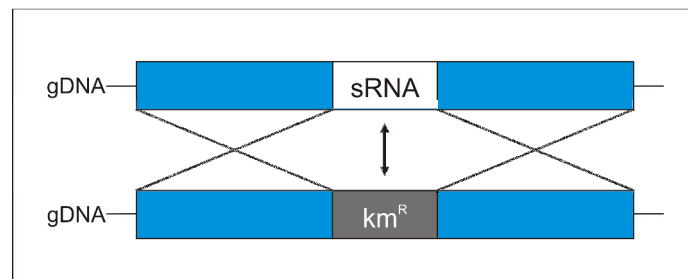


Abbildung 3.15: Schema der Deletion einer sRNA aus dem Genom von *S. coelicolor*

Durch homologe Rekombination der *upstream*- und *downstream*-Bereiche der sRNA wird die sRNA-Sequenz in mehreren Schritten durch einen Selektionsmarker (bspw. Kanamycin) ersetzt.

Dazu wurden 1000 bp *upstream* und *downstream* der sRNA amplifiziert und links bzw. rechts neben ein Resistenzgen inseriert. Nach Konjugation des Deletionsplasmids in *S. coelicolor* paaren die 1000 bp langen Bereiche *upstream* der Resistenz und das Plasmid integriert in das Genom (*single crossover*). Beim zweiten Rekombinationsschritt paart der *downstream*-Bereich der sRNA mit dem ihm homologen Bereich auf dem Rückgrat des Plasmids. Bei einer korrekten Paarung der homologen *downstream*-Bereiche kann das Rückgrat des Plasmids aus dem Genom heraus rekombinieren, während das Resistenzgen im Genom verbleibt (*double crossover*) (Abb. 3.16).

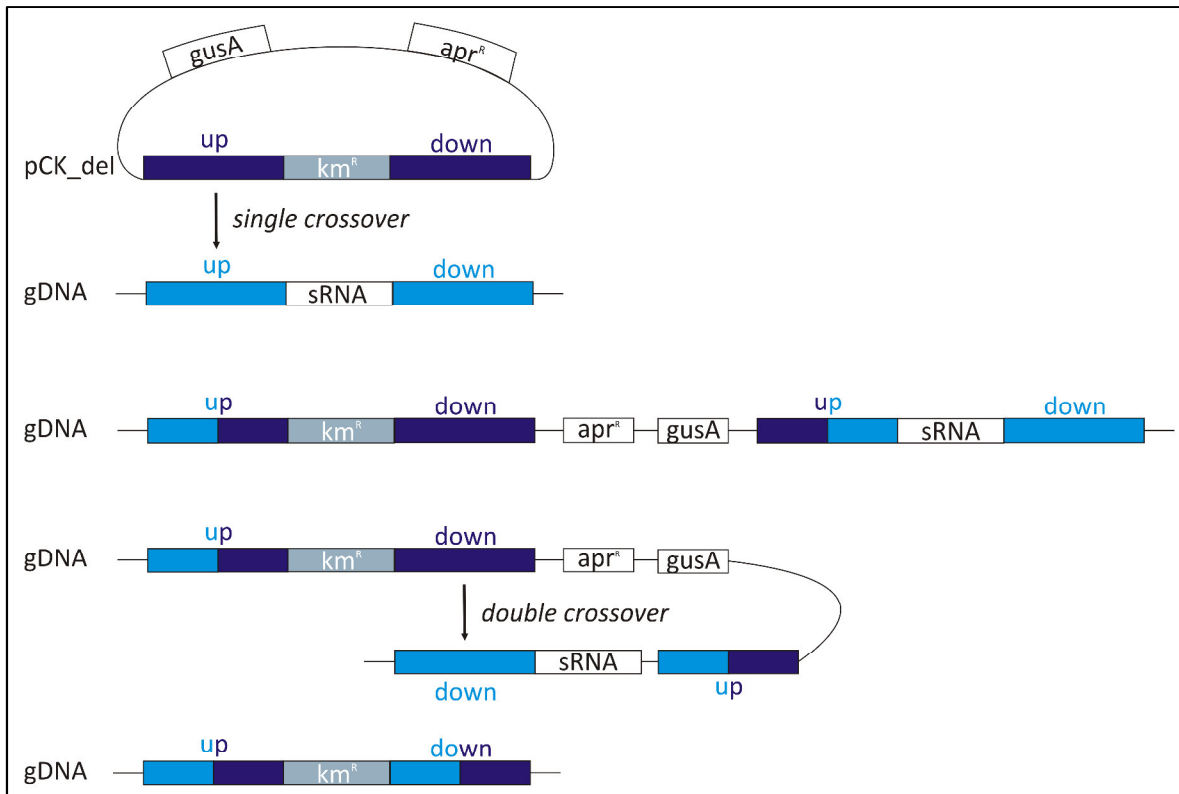


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung einer homologen Rekombination

Sequenzen auf dem Plasmid (dunkelblaue Boxen) paaren mit homologen Bereichen (*upstream*, *up*) auf der genomischen DNA des Organismus (hellblaue Boxen) und das gesamte Plasmid wird linear in das Genom integriert (Einzel-Rekombination oder *single crossover*). Bei einer zweiten Paarung der weiteren homologen Bereiche (*downstream*, *do*) wird das Rückgrat des Plasmids aus dem Genom heraus rekombiniert (Doppel-Rekombination oder *double crossover*).

3.5.2.2 Strategien zur Herstellung der Deletionsplasmide

Die Plasmide zur Einführung einer Deletion durch homologe Rekombination wurden je nach sRNA über verschiedene Strategien erstellt.

3.5.2.2.1 Herstellung der Deletionsplasmide für *scr2736*, *scr2952*, *scr3920* und *scr4389*

Für die Deletionen der sRNA-Sequenzen von *scr2736*, *scr2952*, *scr3920* und *scr4389* wurde das Plasmid pCK (M. Myronovskyi, Saarbrücken) verwendet, welches einen ColE1 *origin* besitzt und daher in *E. coli* replizieren kann (Abb. 3.17). Zudem trägt es einen *oriT* und kann durch Konjugation von *E. coli* auf *S. coelicolor* übertragen werden. In Streptomyceten kann es nicht replizieren und muss somit nur integrieren.

Das Plasmid enthält eine Apramycinresistenz sowie ein *gusA*-Gen, die beide der Selektion des *double crossover* dienen. Die β -Glucuronidase (*gusA*) dient als zusätzlicher Selektionsmarker. Nach Zugabe ihres Substrats X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure) setzt sie dieses in eine blaue Färbung um. Dem *gusA*-Gen ist ein *ptipA*-Promotor vorangestellt. Da beide Selektionsmarker im Rückgrat des Plasmids kodiert sind, gehen diese Eigenschaften nach einem *double crossover* verloren. Eine erfolgreiche Deletion muss Apramycin-sensitiv sowie GusA-negativ sein.

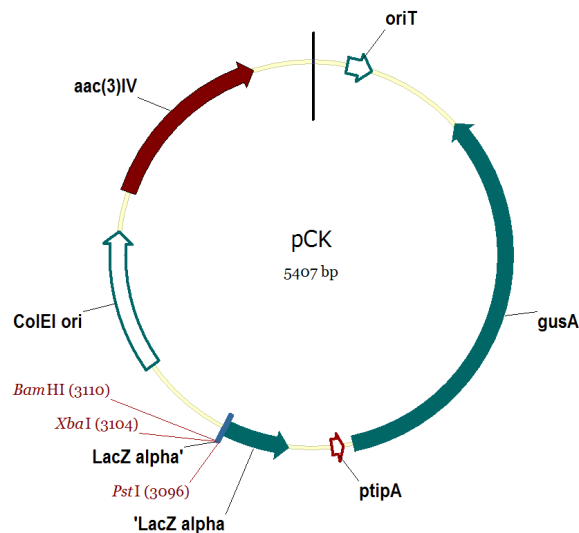


Abbildung 3.17: Das Deletionsplasmid pCK

Das Plasmid pCK trägt den zur Konjugation von *E. coli* auf Streptomyceten nötigen *oriT* sowie einen zur Replikation in *E. coli* notwendigen ColE1 *origin*. Das Gen der β -Glucuronidase (*gusA*) unter Kontrolle des *ptipA*-Promotors dient, wie die Apramycinresistenz (*aac(3)IV*), der Selektion von *double crossover*-Mutanten. Nach Zugabe des Substrats X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure) wird dieses umgesetzt und die das Plasmid enthaltende Kolonie färbt sich blau. LacZ alpha ist ein Fragment des lacZ-Gens der β -Galactosidase. Eingezeichnet sind die für die Herstellung der Deletionsplasmide verwendeten Restriktionsschnittstellen BamHI, XbaI und PstI.

Neben dem pCK-Plasmid wurde für die Herstellung des Deletionsplasmids noch ein weiteres Plasmid verwendet. pJetkmR (M. Vockenhuber, Darmstadt) diente der Zwischeninsertion der Deletionskassette vor dem Einfügen in das für die Konjugation bestimmte pCK-Plasmid. pJetkmR besitzt eine Ampicillin- (*bla*) und Kanamycin-Resistenz (*kmR*) (Abb. 3.18). Der T7-Promotor war für diese Anwendung nicht relevant, ebenso der *plac*-Promotor. Für die Replikation in *E. coli* sorgt das Replikon *rep* (pMB1).

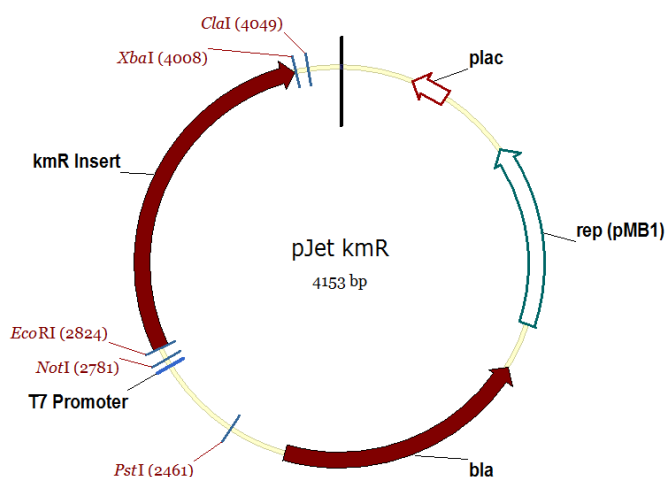


Abbildung 3.18: Zwischeninsertionsplasmid pJetkmR

Das Plasmid zur Zwischeninsertion der Deletionsfragmente enthält bereits die Kanamycinresistenz (*kmR*), welche die sRNA im Genom ersetzen wird sowie eine Ampicillinresistenz (*bla*). Das Replikon *rep* (pMB1) sorgt für die Replikation in *E. coli*. Der T7- und der *plac*-Promotor sind für diese Anwendung nicht von Bedeutung. Eingezeichnet sind die zur Herstellung der Deletionsplasmide verwendeten Restriktionsschnittstellen der Enzyme PstI, NotI, EcoRI, XbaI und ClaI.

Für die Herstellung der Deletionskassette wurden jeweils 1000 bp *upstream* und *downstream* der sRNA-Sequenz von genomischer DNA amplifiziert. An den *upstream*-Bereich wurden an das 5'-Ende mit den Oligonukleotiden die Restriktionsschnittstellen NotI bzw. PstI und eine weiter innen auf dem Oligonukleotid liegende BamHI-Schnittstelle angefügt. Eine EcoRI-Schnittstelle wurde an das 3'-Ende angefügt. An den *downstream*-Bereich wurde mit den verwendeten Oligonukleotiden am 5'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingefügt, am 3'-Ende wurden die Restriktionsschnittstellen BamHI (innenliegend) und ClaI (außenliegend) angefügt (Abb. 3.19). Die *upstream*- und *downstream*-Bereiche wurden mit den Schnittstellen zur Zwischeninsertion in pJetkmR verdaut (*upstream*: NotI bzw. PstI und EcoRI; *downstream*: XbaI und ClaI) und nacheinander in das Plasmid ligiert.

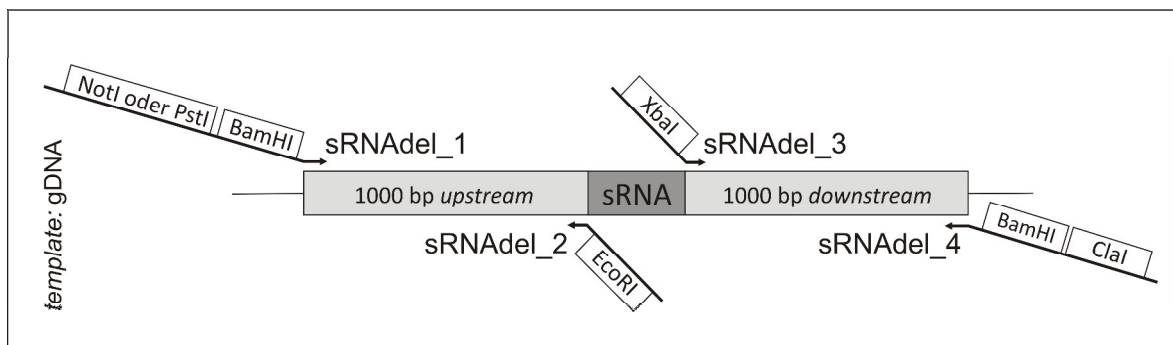


Abbildung 3.19: Strategie zur Herstellung der Deletionsplasmide

Mit den Oligonukleotiden wurden bei der PCR-Reaktion zum einen Restriktionsschnittstellen zur Zwischeninsertion in pJetkmR (NotI bzw. PstI und ClaI außenliegend auf der Oligonukleotidsequenz) eingeführt. Zum anderen wurde die Restriktionsschnittstelle BamHI weiter innenliegend auf der Oligonukleotidsequenz zur Überführung des Fragments in das pCK-Plasmid an die DNA angefügt. Die Oligonukleotide direkt an der sRNA-Sequenz fügten die Schnittstellen EcoRI und XbaI zur Zwischeninsertion in pJetkmR an. Die Oligonukleotide sind exemplarisch mit sRNAAdel_1-4 benannt. Die genaue Bezeichnung entsprechend der jeweiligen sRNA ist Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Mit der BamHI-Schnittstelle wurde die aus *upstream*-Bereich, Kanamycingen und *downstream*-Bereich bestehende Deletionskassette aus pJetkmR herausgeschnitten und am Stück in das pCK-Plasmid ligiert (Abb. 3.17). Für die Herstellung des Deletionsplasmids von scr3920 wurden für die Insertion der Kassette aus pJetkmR in pCK die Restriktionsschnittstellen PstI und BamHI genutzt. Die verwendeten Oligonukleotide können Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Oligonukleotide der Herstellung der Deletionsplasmide für die sRNAs scr2736, scr2952, scr3920 und scr4389

sRNA	Abkürzung	Oligonukleotid	eingefügte Schnittstellen
scr2736	2del	2del_1	NotI_BamHI
		2del_2	EcoRI
		2del_3	XbaI
		2del_4	BamHI_ClaI
scr2952	29del	29del_1	PstI_BamHI
		29del_2	EcoRI
		29del_3	XbaI
		29del_4	BamHI_ClaI
scr3920	3del	3del_1	PstI
		3del_2	EcoRI

		3del_3	XbaI
		3del_4	BamHI_ClaI
scr4389	43del	43del_1	NotI_BamHI
		43del_2	EcoRI
		43del_3	XbaI
		43del_4	BamHI_ClaI

3.5.2.2.2 Herstellung der Deletionsplasmide für scr4115

Für die Herstellung der Deletion von scr4115 musste eine leicht abgewandelte Strategie angewendet werden, da die zu inserierenden 1000 bp *upstream* und *downstream* der sRNA bereits eine BamHI-Schnittstelle enthielten. An das amplifizierte *upstream*-Fragment wurden mit den verwendeten Oligonukleotiden die Schnittstellen PstI und EcoRI eingefügt, an das *downstream*-Fragment wurden mit den Oligonukleotiden die Schnittstellen XbaI und PstI angefügt. Der *upstream*-Bereich wurde über die eingeführten Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pJetkmR inseriert. Der *downstream*-Bereich wurde *blunt* in das kommerziell erhältliche System des CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher, Darmstadt) inseriert.

Das in Abbildung 3.20 dargestellte pJet 1.2-Plasmid enthält das Replicon rep (pMB1) zur Replikation in *E. coli* und eine Ampicillinresistenz (bla) als Selektionsmarker. Das unter der Kontrolle des Plac-Promotors stehende Gen *eco47IR* kodiert für ein Typ-2 Restriktionsenzym, welches das Plasmid zerstört, wenn bei der Ligation keine DNA inseriert wird. Die verwendeten Oligonukleotide und die mit ihnen eingeführten Restriktionsschnittstellen sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

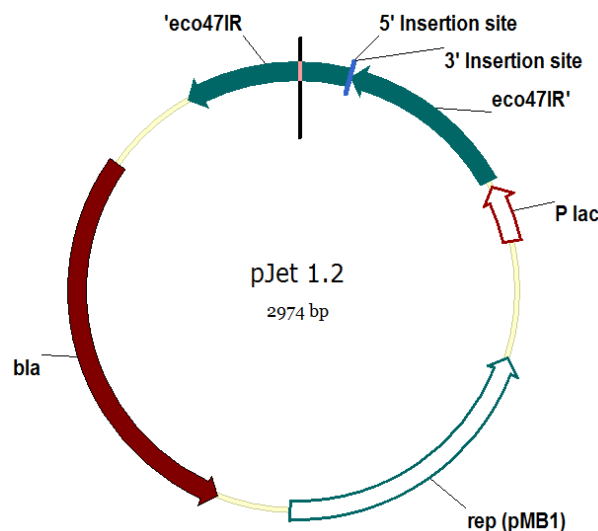


Abbildung 3.20: pJet 1.2-Plasmid des CloneJET PCR Cloning Kits

Das pJet 1.2-Plasmid trägt eine Ampicillinresistenz (bla) und ein Replicon zur Replikation in *E. coli* (rep (pMB1)). Plac ist ein modifizierter Promotor für die Expression von *eco47IR*. *Eco47IR* kodiert für ein Typ-2 Restriktionsenzym, das bei nicht inseriertem Konstrukt (an der 5'- und 3'-insertion site) vollständig abgelesen wird und das Plasmid zerstört.

Tabelle 3.5: Oligonukleotide der Herstellung des Deletionsplasmids für die sRNA 4115

sRNA	Abkürzung	Oligonukleotid	eingefügte Schnittstellen
scr4115	41del	41del_1	PstI
		41del_2	EcoRI
		41del_3	XbaI
		41del_4	PstI

Der *upstream*-Bereich wurde gemeinsam mit der Kanamycinresistenz mit Hilfe der Schnittstellen PstI und XbaI aus dem Plasmid pJEtKmR herausgeschnitten. Die gleichen Schnittstellen wurden verwendet, um das *downstream*-Fragment aus pJet 1.2 herauszuschneiden. Beide Fragmente wurden gleichzeitig in das mit PstI linearisierte Plasmid pCK ligiert (Abb. 3.21).

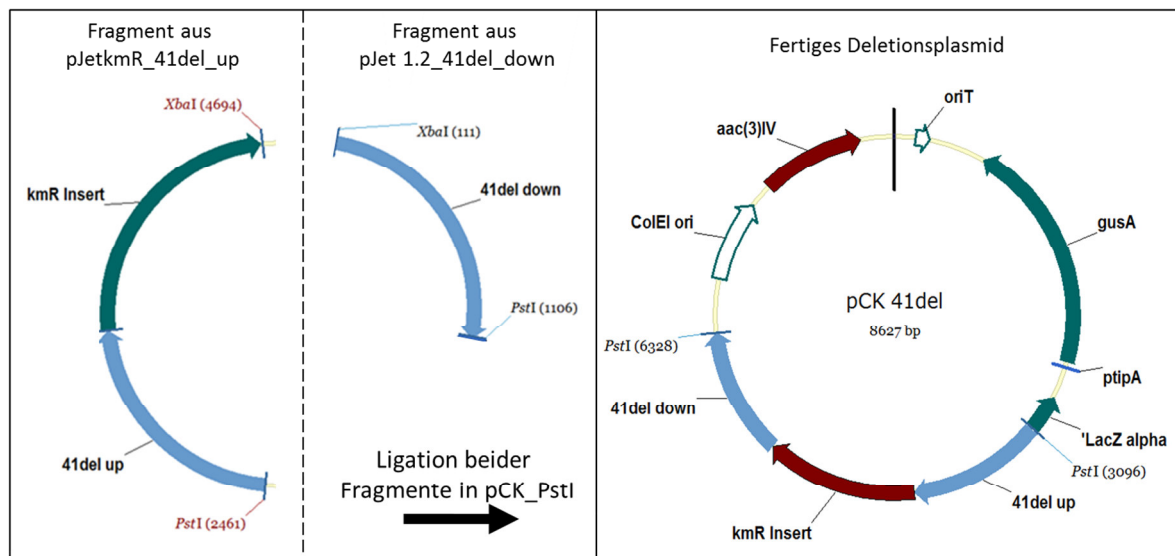


Abbildung 3.21: Ligation des *upstream*-Bereichs von scr4115 mit Kanamycinresistenz und des *downstream*-Bereichs von scr4115 in das pCK-Plasmid

Der *upstream*-Bereich von scr4115 wurde zusammen mit der Kanamycinresistenz über die Schnittstellen PstI und XbaI aus dem pJEtKmR-Plasmid herausgeschnitten. Das *downstream*-Fragment wurde mit XbaI und PstI aus pJet 1.2 herausgeschnitten. Beide Fragmente wurden gleichzeitig in das mit PstI verdaute pCK-Plasmid ligiert.

3.5.2.2.3 Herstellung der Deletionsplasmide für scr4632 und scr6925

Für die Herstellung der Deletionsplasmide von scr4632 und scr6925 wurde eine andere Strategie angewendet.

Für die Herstellung der Deletionsplasmide wurden zunächst einzelne Fragmente hergestellt, die mittels *overlap*-PCR verbunden wurden. Die Kanamycinresistenz wurde mit den Oligonukleotiden 4up_km_fwd und 4down_km_rev aus dem Plasmid pK18_6925_koab amplifiziert. Dieses Plasmid stand aus einer früheren Arbeit zur Verfügung und wurde nur für die Amplifikation der Kanamycinresistenz verwendet (Diplomarbeit, Nona Heueis). Die verwendeten Oligonukleotide fügten an beiden Seiten Überhänge an. Am 5'-Ende der Kanamycinresistenz wurden 20 bp *overlap* zum 3'-Ende des *upstream*-Bereichs der sRNA angefügt und am 3'-Ende der Kanamycinresistenz 20 bp *overlap* zum 5'-Ende des *downstream*-Bereichs der sRNA (Abb. 3.22 1. PCR).

Der Bereich *upstream* der sRNA wurde mit 4up_fwd und 4up_km_rev amplifiziert. Hierbei wurde am 5'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingebracht. Ein 20 bp langer *overlap* zur Kanamycinresistenz

wurde an das 3'-Ende angehängt. Der Bereich *downstream* der sRNA wurde mit 4down_km_rev und 4down_rev amplifiziert. Am 5'-Ende des Fragments wurde eine 20 bp lange Sequenz komplementär zum 3'-Ende der Kanamycinresistenz eingefügt. Am 3'-Ende des *downstream*-Fragments wurde eine XbaI-Schnittstelle an die Sequenz angehängt. Die einzelnen DNA-Fragmente (1000 bp *upstream*-Bereich, Kanamycinresistenz, 1000 bp *downstream*-Fragment) wurden durch eine *overlap*-PCR miteinander verbunden (Abb. 3.22 2. PCR und *overlap*-PCR).

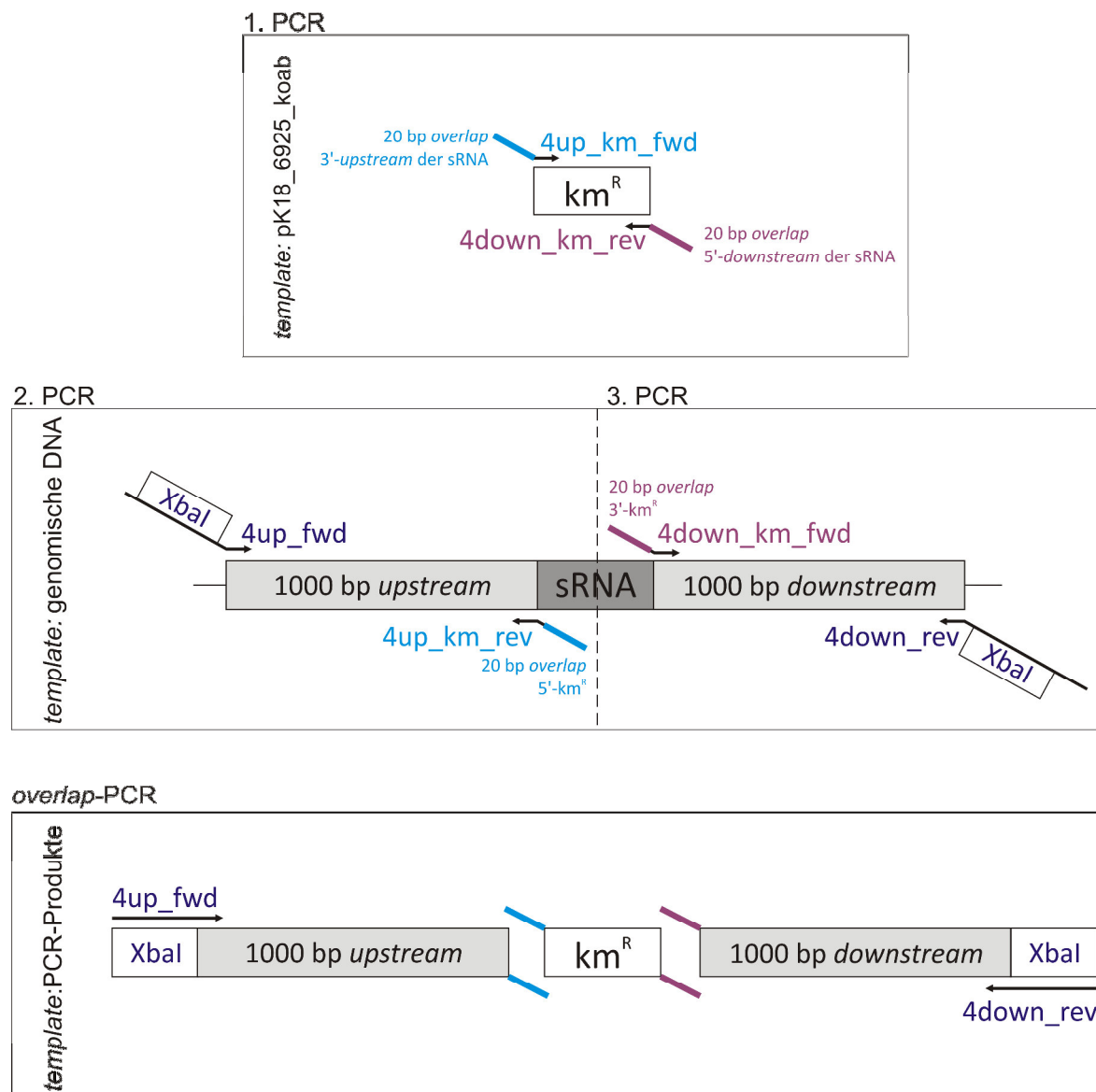


Abbildung 3.22: Strategie zur Herstellung der Deletionsplasmide für scr4632 und scr6925

In drei einzelnen Reaktionen wurden die Fragmente zur Konstruktion des Deletionsplasmids (Kanamycinresistenz, *upstream*- und *downstream*-Bereich) amplifiziert und anschließend mit den außenliegenden Oligonukleotiden 4up_fwd und 4down_rev in einer *overlap*-PCR zusammengeführt. Bei der Herstellung der Deletionsplasmide von scr6925 sind die Oligonukleotide jeweils mit einer „6“ bezeichnet (Tab. 3.6).

Die fertige Gesamtsequenz wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und in das ebenfalls mit XbaI verdaute pCK-Plasmid ligiert (Abb. 3.23). Die gleiche Strategie wurde für die Herstellung der Deletionsplasmide für die sRNA scr6925 durchgeführt, die Oligonukleotide waren hierbei mit einer „6“ benannt, wie Tabelle 3.6 zu entnehmen ist.

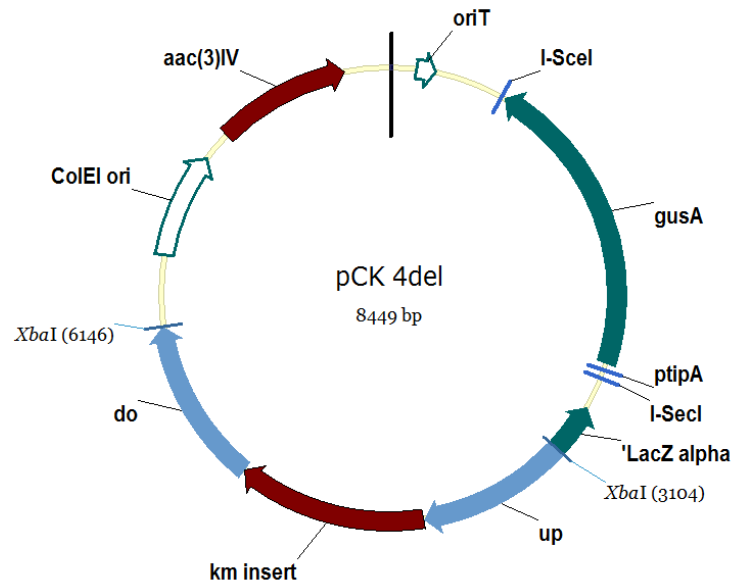


Abbildung 3.23: Plasmid zur Deletion von scr4632

Die durch *overlap*-PCR hergestellte Deletionskassette aus *upstream*- und *downstream*-Bereich der sRNA scr4632 mit der Kanamycinresistenz wurden in die XbaI-Schnittstelle des pCK-Plasmids ligiert.

Tabelle 3.6: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der Deletionsplasmide von scr4632 und scr6925

sRNA	Abkürzung	Oligonukleotid	eingefügte Schnittstellen oder Sequenzen
scr4632	4del	4_up_fwd	XbaI
		4_up_km_rev	20 bp <i>overlap</i> 5'-Ende Kanamycinresistenz
		4_up_km_fwd	20 bp <i>overlap</i> 3'-Ende sRNA
		4_down_km_rev	20 bp <i>overlap</i> 5'-Ende sRNA
		4_down_km_fwd	20 bp <i>overlap</i> 3'-Ende Kanamycinresistenz
		4_down_rev	XbaI
scr6925	6del	6_up_fwd	XbaI
		6_up_km_rev	20 bp <i>overlap</i> 5'-Ende Kanamycinresistenz
		6_up_km_fwd	20 bp <i>overlap</i> 3'-Ende sRNA
		6_down_km_rev	20 bp <i>overlap</i> 5'-Ende sRNA
		6_down_km_fwd	20 bp <i>overlap</i> 3'-Ende Kanamycinresistenz
		6_down_rev	XbaI

3.5.3 Übersicht der Erfolge der Plasmidherstellung

Es konnten alle Überexpressionsplasmide der bearbeiteten sRNAs fertiggestellt werden. Bei den erstellten Deletionsplasmiden konnte für die sRNAs scr3920 und scr4115 kein Plasmid hergestellt werden. Tabelle 3.7 ist zu entnehmen, welche sRNAs erfolgreich überexprimiert und deletiert werden konnten.

Alle fertiggestellten Plasmide konnten in *S. coelicolor* konjugiert werden. Die Deletion von scr4632 und scr6925 ist noch im Status des *single crossover*, während die Deletionen von scr2736, scr2952 und scr4389 nach einem *double crossover* erfolgreich waren.

Tabelle 3.7: Übersicht über die Erfolge der Erstellung von Überexpressions- und Deletionsplasmiden

sRNA	Herzustellendes Plasmid	Erfolg Herstellung	resultierender Stamm	Abkürzung
Überexpressionsmutanten				
scr2736	pGMsT_2oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_2oe	2oe
scr2952	pGMsT_29oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_29oe	29oe
scr3920	pGMsT_3oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_3oe	3oe
scr4115	pGMsT_41oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_41oe	41oe
scr4389	pGMsT_43oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_43oe	43oe
scr4632	pGMsT_4oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_4oe	4oe
scr6925	pGMsT_6oe	+	<i>S. coelicolor</i> /pGMsT_6oe	6oe
Deletionsmutanten				
scr2736	pCK_2del	+	<i>S. coelicolor</i> Δscr2736	2del
scr2952	pCK_29del	+	<i>S. coelicolor</i> Δscr2952	29del
scr3920	pCK_3del	-	-	-
scr4115	pCK_41del	-	-	-
scr4389	pCK_43del	+	<i>S. coelicolor</i> Δscr4389	43del
scr4632	pCK_4del	+	<i>S. coelicolor</i> /pCK_4del	4delP
scr6925	pCK_6del	+	<i>S. coelicolor</i> /pCK_6del	6delP

3.5.4 Nachweis des veränderten Expressionslevels der sRNAs im Northern Blot

Die Expressionslevel der sRNAs wurden nach Überexpression und Deletion der Transkripte mittels Northern Blot-Analyse überprüft. Die Mutationsstämme wurden hierzu für 96 h in 3% TSB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (Überexpressionen mit Apramycin; Deletionen mit Kanamycin) angezogen und die RNA isoliert. Als Kontrolle wurden der *S. coelicolor* Wildtyp (WT) und der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs mitgeführt (pGM). Der Wildtyp ohne Plasmid dient als Referenz für die Deletionsstämme, da beide keine Plasmide tragen (das Plasmid rekombiniert beim zweiten Reaktionsschritt der homologen Rekombination aus dem Genom heraus, die sRNA wird durch das Resistenzgen ersetzt). Die Überexpressionsstämme tragen ein Plasmid, weshalb die Referenz ebenfalls ein Plasmid trägt. Das Plasmid pGMs ist mit pGMsT fast identisch, die zusätzliche Terminatorsequenz hinter der Insertionsstelle fehlt (Abb. 3.12).

3.5.4.1 Überexpression und Deletion der sRNA scr2736

Neben den Referenzstämmen WT und pGM wurden die Überexpression von scr2736 (2oe) und die Deletion von scr2736 (2del) angezogen und die daraus isolierte RNA für den in Abbildung 3.24 gezeigten Northern Blot verwendet. Die Quantifizierung des Northern Blots ist in der gleichen Abbildung gezeigt. Die Überexpression der sRNA scr2736 funktionierte sehr gut. Im Northern Blot sieht man eindeutig ein stark erhöhtes Signal des Transkriptes bei etwa 65 nt. Das Transkript bei 65 nt ist zudem deletiert, es kann kein Signal im Northern Blot detektiert werden. Die Herkunft der Transkripte größer als 65 nt konnte nicht geklärt werden. Eine unspezifische Bindung des als Sonde verwendeten Oligonukleotids ist nicht auszuschließen.

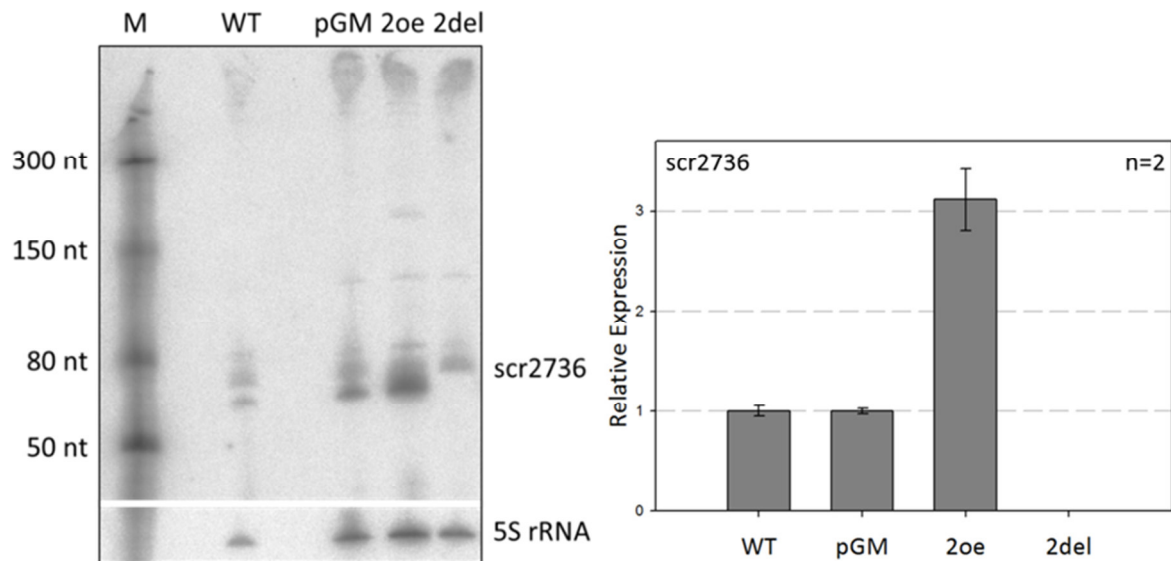


Abbildung 3.24: Expressionsanalyse der sRNA scr2736 in Überexpressions- und Deletionsstämmen

Links Das Expressionslevel der sRNA scr2736 wurde in den Referenzstämmen des Wildtyps (WT) und des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie in den Überexpressions- und Deletionsstämmen von scr2736 (2oe bzw. 2del) überprüft. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Rechts** Quantifizierung der Expression des gezeigten Northern Blots.

3.5.4.2 Überexpression und Deletion der sRNA scr2952

Das Expressionslevel von scr2952 wurde in den Stämmen WT und pGM sowie in der Überexpression von scr2952 (29oe) und der Deletion (29del) überprüft. Der Northern Blot aus Abbildung 3.25 und dessen Quantifizierung zeigt eine erfolgreiche Überexpression.

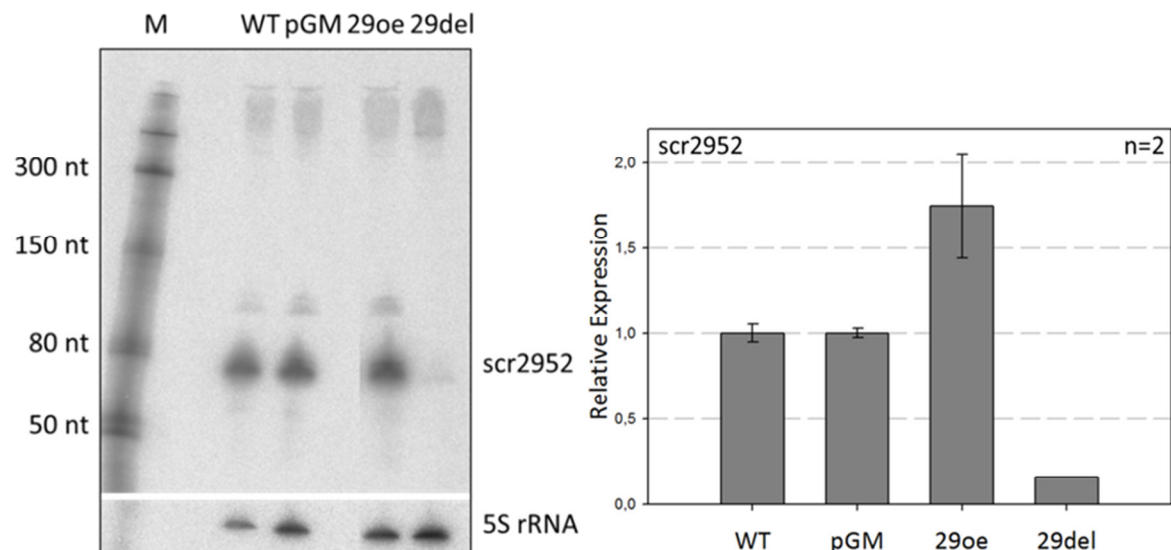


Abbildung 3.25: Expressionsanalyse der sRNA scr2952 in Überexpressions- und Deletionsstämmen

Links Das Expressionslevel der sRNA scr2952 wurde in den Referenzstämmen des Wildtyps (WT) und des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie in den Überexpressions- und Deletionsstämmen (29oe bzw. 29del) überprüft. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Rechts** Quantifizierung der Expression des gezeigten Northern Blots.

Die Deletion der sRNA scr2952 zeigte im Northern Blot immer noch ein schwaches Signal. Da es sich bei *S. coelicolor* um ein im Zellverbund wachsendes Bakterium handelt, ist es möglich, dass trotz mehrfacher Vereinzelung bei der Sporenernte Sporen unterschiedlichen Deletionsstatus vermischt wurden. Wenn die Sporen der Zellen, in denen noch keine Deletion stattgefunden hatte, mit denen einer fertigen Deletion zusammen angezogen werden, kann so ein Mischsignal entstehen. Der Status der Deletionsmutante wird nochmals überprüft.

3.5.4.3 Überexpression der sRNAs scr3920 und scr4115

Für die sRNAs scr3920 und scr4115 wurde das Expressionslevel in deren Überexpressionsmutanten (3oe bzw. 41oe) überprüft. Als Referenz wurde pGM mitgeführt (Abb. 3.26). Die Quantifizierung des Northern Blots ist in der gleichen Abbildung dargestellt. Die Northern Blot-Analyse zeigte für beide sRNAs eine eindeutige Überexpression im jeweiligen Stamm. Für beide sRNAs konnten mit der für den Northern Blot verwendeten Oligonukleotidsonde mehrere weitere Transkriptlängen bei 300 nt und kleiner als 80 nt detektiert werden.

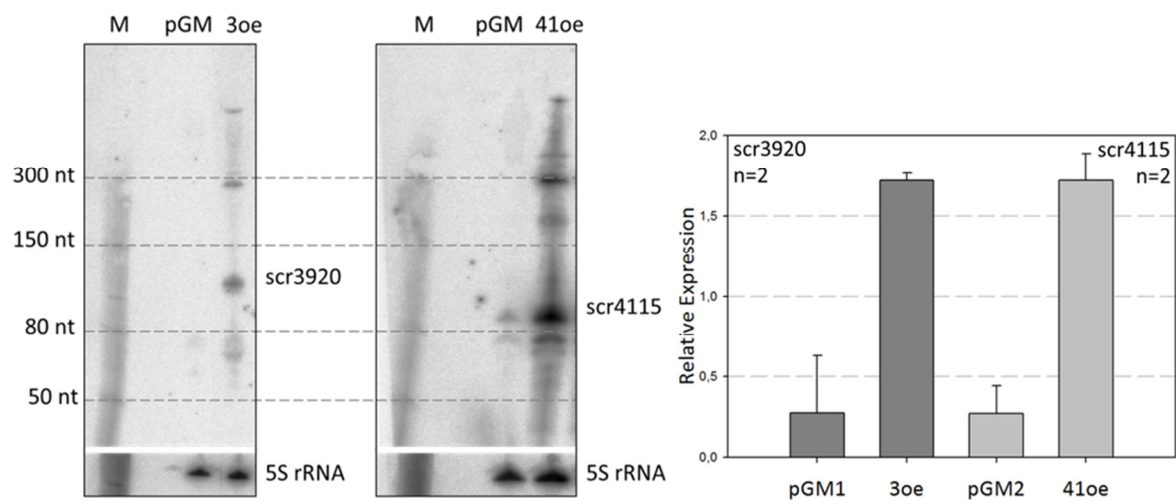


Abbildung 3.26: Expressionsanalyse der Überexpressionsstämme von scr3920 und scr4115

Oben Die Expression der Überexpressionen von scr3920 (3oe) und scr4115 (41oe) wurde in einer Northern Blot-Analyse untersucht. Als Referenz wurde der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) verwendet. Die Low Range ssRNA Leiter diente als Marker (M). **Unten** Quantifizierung der Expression von scr3920 bzw. scr4115 im jeweilig gezeigten Northern Blot.

3.5.4.4 Überexpression und Deletion der sRNA scr4389

Die Expression der sRNA scr4389 in den Überexpressions- und Deletionsmutanten (43oe bzw. 43del) wurde zusammen mit der Expression in den Referenzstämmen WT und pGM überprüft. Der Northern Blot und dessen Quantifizierung sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Die Überexpression der sRNA war eher gering. Die Deletion dagegen hatte sehr gut funktioniert, es war kein Signal im Deletionsstamm zu detektieren.

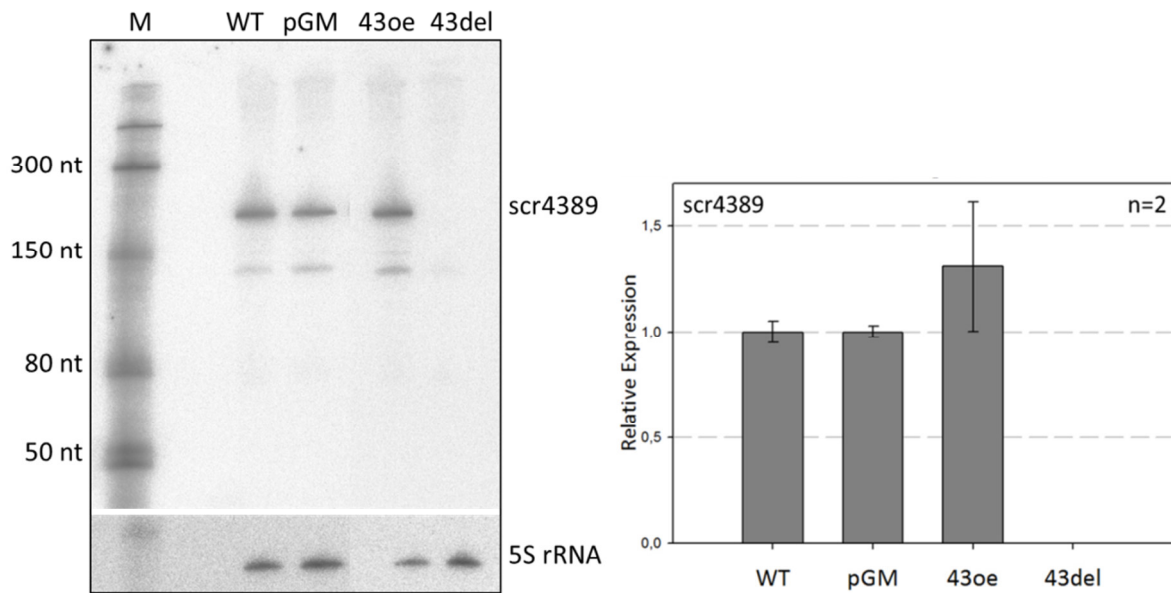


Abbildung 3.27: Expressionsanalyse der sRNA scr4389 in Überexpressions- und Deletionsstämmen

Links Die Expression von scr4389 wurde im Wildtyp (WT), im Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie im Überexpressions- und Deletionsstamm von scr4389 (43oe bzw. 43del) durch Northern Blot-Analyse überprüft. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Rechts** Quantifizierung der Expression des gezeigten Northern Blots.

3.5.4.5 Überexpression und Deletion der sRNA scr4632

Der Überexpressions- und Deletionsstamm von scr4632 (4oe bzw. 4delP) wurde neben den Referenzstämmen WT und pGM zur Analyse im Northern Blot angezogen. Der Northern Blot und die zugehörige Quantifizierung sind in Abbildung 3.28 abgebildet. Die Überexpression von scr4632 (4oe) war eher gering. Neben dem Transkript bei 118 nt wurden jedoch die kleineren prozessierten Transkripte auch leicht überexprimiert. Die Quantifizierung der Gesamtexpression des Haupttranskripts zusammen mit den kleineren Transkripten (Abb. 3.28 rechts in hellgrau) ergab eine deutlichere Überexpression als die Quantifizierung des Haupttranskripts allein (Abb. 3.28 rechts dunkelgrau). Es lag jedoch keine Deletion der sRNA vor. In Kapitel 3.7 wird näher auf die sRNA scr4632, deren Überexpression und unvollständige Deletion eingegangen.

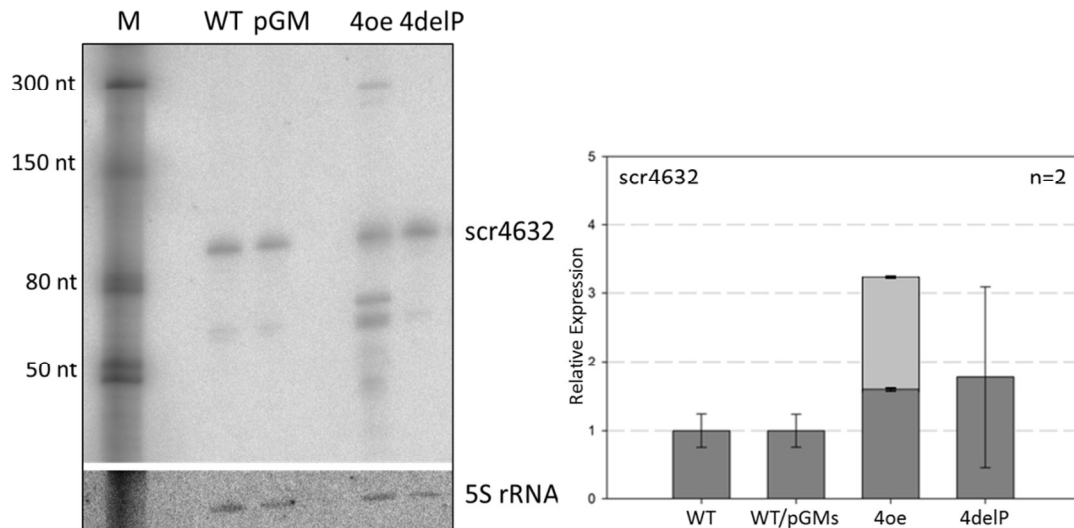


Abbildung 3.28: Expressionsanalyse der sRNA scr4632 in Überexpressions- und Deletionsstämmen

Links Die Expressionsänderung in den Überexpressions- und Deletionsstämmen von scr4632 (4oe bzw. 4delP) wurde durch Northern Blot-Analyse überprüft. Die Stämme des Wildtyps (WT) und des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden als Referenz mitgeführt. Als Marker wurde die Low Range ssRNA Leiter (M) verwendet. **Rechts** Quantifizierung der Expression von scr4632 des oben gezeigten Northern Blots. Quantifiziert wurden die Bande des Haupttranskripts (dunkelgrau) und die Gesamtexpression der Hauptbande bei 118 nt zusammen mit den kleineren Transkripten (hellgrau).

3.5.4.6 Überexpression und Deletion der sRNA scr6925

Das Level der Expression von Überexpression und Deletion der sRNA scr6925 (6oe bzw. 6delP) wurde im Vergleich zum WT und pGM betrachtet. Der Northern Blot und dessen Quantifizierung sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Überexpression von scr6925 funktionierte sehr gut. Die Deletion der sRNA funktionierte dagegen nicht. Zur sRNA scr6925 und deren Überexpressions- und Deletionsmutanten sind in Kapitel 3.7 ebenfalls weitere Daten aufgeführt.

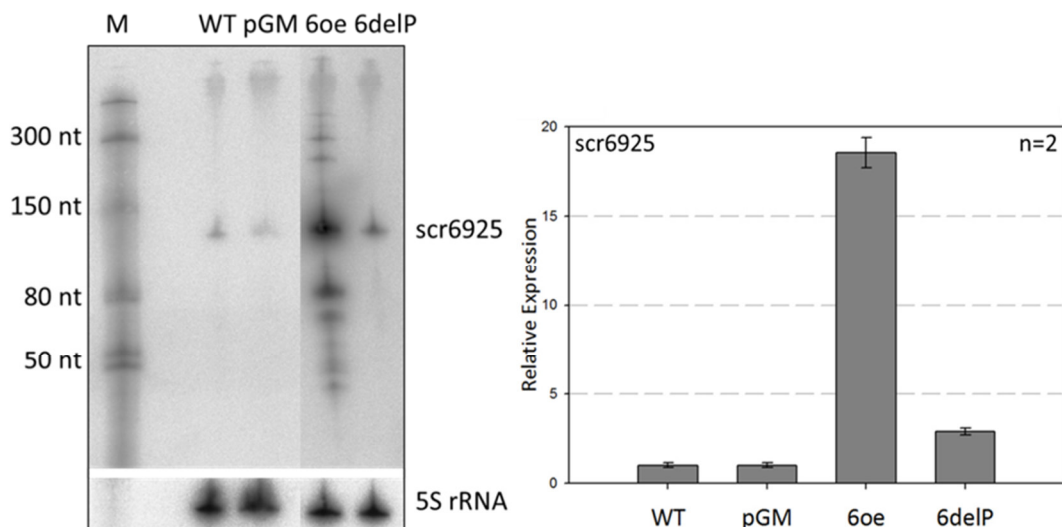


Abbildung 3.29: Expressionsanalyse der sRNA scr6925 in Überexpressions- und Deletionsstämmen

Links Das Expressionslevel der sRNA scr6925 wurde in den Referenzstämmen des Wildtyps (WT) und des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie in den Überexpressions- und Deletionsstämmen (6oe bzw. 6delP) überprüft. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Rechts** Quantifizierung der Expression von scr6925 des gezeigten Northern Blots.

3.6 Analyse der sRNA-Mutanten auf Festmedium

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die veränderte Expressionsstärke auf die Physiologie der sRNAs auswirkte. Die Überexpressionsmutanten der sRNA-Kandidaten wurden dazu auf verschiedenen Festmedien angezogen.

Hierzu wurden die vorgekeimten Sporen der Überexpressionsstämme auf unterschiedlichen Medien ausgestrichen. Als Referenz für die Plasmid-tragenden Überexpressionsstämme wurde der Wildtyp von *S. coelicolor* mit Leerplasmid pGMs (pGM) mitgeführt. Diese Art der Anzucht machte eine sofortige Beobachtung von unterschiedlichem Wachstum der Stämme möglich. Parallel dazu wurden vorgekeimte Sporen flächig auf einzelne Festmediums-Platten ausgestrichen (50 µl Sporen/ Platte in 150 µl 3% TSB-Flüssigmedium) und Filterplättchen auf die Oberfläche gelegt. Das Testsupplement wurde in gelöster Form auf die Filter getropft. Bei diesem Versuchsaufbau wurden Wachstumsveränderungen bzw. ein Hemmhof rund um die Filterplättchen sichtbar.

3.6.1 Stressbedingungen auf Festmedium

Die Überexpressionen aller sieben sRNAs und der Referenzstamm wurden bei durch Metallionen induzierten Stressbedingungen angezogen.

S. coelicolor als Bodenbakterium kann in seinem natürlichen Habitat einer schwankenden Konzentration von Metallionen ausgesetzt sein. Während die meisten Metallionen in geringen Konzentrationen vorliegen und für bakterielles Wachstum nötig sind, sind andere Metalle schon in geringen Konzentrationen toxisch für den Organismus. (Abbas & Edwards, 1990; Weinberg, 1990)

Von jedem Stamm wurde eine Kultur auf Soja-Mannitol-Vollmedium (SM) und Minimalmedium (MM) angelegt. Auf die Platten wurden Filterplättchen gelegt und diese mit je 5 µl einer 100 mM Metalllösung getränkt. Es wurden die Metalllösungen Manganchlorid (MnCl_2), Eisensulfat (FeSO_4), Eisenchlorid (FeCl_2), Ammoniumeisencitrat, Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), Zinkchlorid (ZnCl_2), Zinksulfat (ZnSO_4), Nickelchlorid (NiCl_2), Kupferchlorid (CuCl_2), Silbernitrat (AgNO_3) und Lithiumchlorid (LiCl) verwendet. Natriumnitrat (NaNO_3) wurde als Kontrolle mitgeführt. Aus Tabelle 3.8 und Abbildung 3.30 kann die Verteilung der behandelten Filterplättchen auf dem Medium abgelesen werden.

Tabelle 3.8: Metalllösungen zur Suche nach Phänotypen auf Festmedium

Filter	Metallverbindung	Abkürzung
1	Manganchlorid-Dihydrat	MnCl ₂
2	Eisensulfat-Heptahydrat	FeSO ₄
3	Eisenchlorid-Hexahydrat	FeCl ₂
4	Ammoniumeisencitrat	--
5	Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
6	Zinkchlorid	ZnCl ₂
7	Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO ₄
8	Nickelchlorid-Hexahydrat	NiCl ₂
9	Kupferchlorid-Dihydrat	CuCl ₂
10	Silbernitrat	AgNO ₃
11	Lithiumchlorid	LiCl
12	Natriumnitrat	NaNO ₃

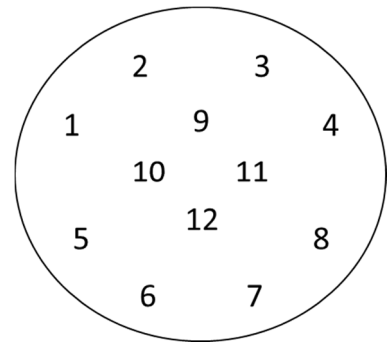


Abbildung 3.30: Schema der auf dem Festmedium aufgetragenen Filterplättchen

Die Überexpressionsstämme der sRNAs scr2736 (2oe), scr2952 (29oe), scr3920 (3oe), scr4115 (41oe), scr4389 (43oe), scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) und die Referenz des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden auf Soja-Mannitol- und Minimalmedium ausgestrichen. Auf das Medium wurden sterile Filterplättchen gelegt. Auf jedes Filterplättchen wurden je 5 µl der in Tab. 3.8 aufgeführten Metalllösungen getropft.

Auf Vollmedium (SM) änderte sich das Wachstumsverhalten des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) mit Ausnahme von NiCl₂ nicht. Direkt um NiCl₂ herum war das Wachstum verzögert und es war dort nur weißes Luftmyzel zu sehen, während die Zellen auf der restlichen Platte bereits sporulierten (graue Färbung des Myzels). Auf Minimalmedium (MM) trat der Einfluss der Metalllösungen auf pGM deutlicher hervor. Um CuCl₂ war auf MM ein eindeutiger Hemmhof zu sehen, dort wuchsen keinerlei Zellen. NiCl₂ hemmte ebenfalls das Wachstum, wobei der Hemmhof kleiner war als der um CuCl₂. Die Metalllösungen FeSO₄, Ammoniumeisencitrat, ZnCl₂ und ZnSO₄ induzierten ein leicht gesteigertes Wachstum, zu erkennen am dichteren ringförmigen Wachstum des Luftmyzels um das jeweilige Filterplättchen. Fotografien der entsprechenden Platten sind in Abbildung 3.31 dargestellt.

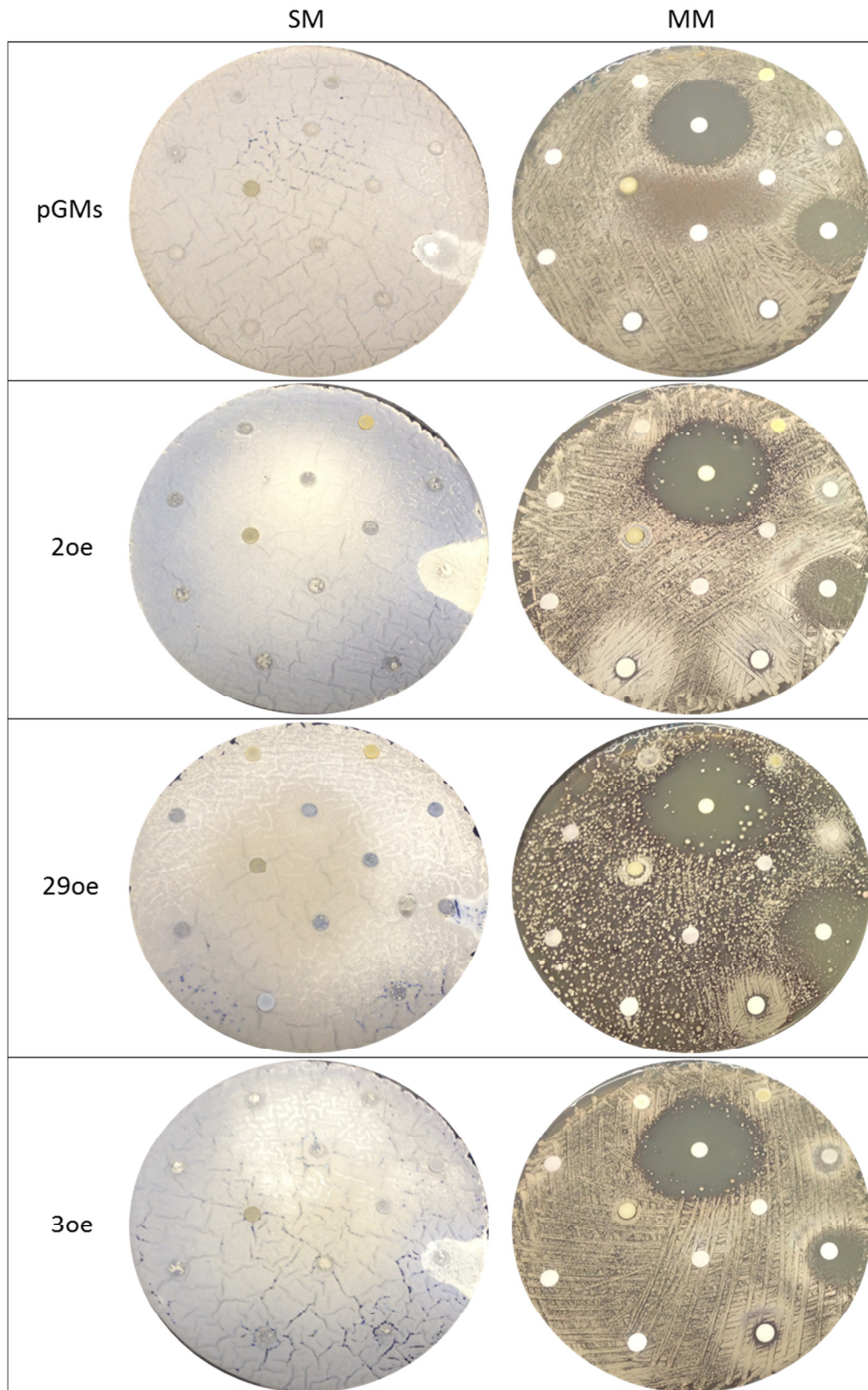


Abbildung 3.31: Phänotypensuche auf Festmedium unter Metallionenstress

Auf Soja-Mannitol- (SM) und Minimalmedium (MM) wurden vorgekeimte Sporensuspensionen der Überexpressionsstämme der sRNAs scr2736 (2oe), scr2952 (29oe), scr3920 (3oe) und als Referenz der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) ausgestrichen. Anschließend wurden Filterplättchen auf das Medium gelegt und auf jedes Plättchen eine der Metalllösungen getropft. Die Platten wurden für 10 d bei 28°C inkubiert. Abbildung 3.30 und Tabelle 3.8 ist zu entnehmen, welche Lösung auf welches Filterplättchen aufgetragen wurde.

Der Überexpressionsstamm von scr2736 (2oe) wuchs auf SM insgesamt schneller. Zu erkennen war dies an der vollbewachsenen Fläche der Platte sowie daran, dass sich der äußere Rand bereits durch Actinorhodinproduktion bläulich anfärbte. Die Mitte der Platte war ebenfalls dicht bewachsen, allerdings war das Wachstum hier leicht verzögert, da noch kein Actinorhodin produziert wurde. Anscheinend beschleunigten die auf den äußeren Filterplättchen aufgetragenen Substanzen das Wachstum, während die in der Plattenmitte aufgetropften Lösungen diese Kapazität nicht hatten. Auch die Überexpression von scr2736 (2oe) zeigte um NiCl_2 wieder das sehr stark verzögerte Wuchsverhalten, welches bereits bei pGM zu sehen war. Das Wuchsmuster auf MM ähnelte dem des Stammes pGM, allerdings waren die Effekte insgesamt stärker. Der Hemmhof um CuCl_2 war größer, um NiCl_2 war der Hemmhof vergleichbar mit dem des Referenzstamms. Das Wachstum um FeSO_4 , Ammoniumeisencitrat, ZnCl_2 und ZnSO_4 und auch AgNO_3 war deutlich markanter. Bei NaNO_3 , das zur Kontrolle für AgNO_3 mitgeführt wurde, war kein erhöhtes Wachstum zu erkennen. Der Effekt um AgNO_3 war demnach vermutlich nicht auf das enthaltene Nitrat, sondern auf das Silber in der Lösung zurückzuführen. Der ringförmige Bereich, in dem die Zellen um die jeweiligen Metalllösungen wuchsen, war dichter bewachsen und etwas ausgedehnter als bei pGM. Zudem wuchs 2oe im Übergangsbereich zwischen NiCl_2 und LiCl_2 sehr gut. Hier waren sogar schon fertige Sporen (grauer Bereich im weißen Luftmyzel) vorhanden.

Der Überexpressionsstamm von scr2952 (29oe) zeigte ein sehr ähnliches Wuchsmuster wie die bereits beschriebenen Stämme von *S. coelicolor*. Die SM-Platte war dicht, das Areal um NiCl_2 ebenfalls bewachsen. Man sah hier nur einen kleineren veränderten Bereich. Auf MM waren die Hemmhöfe um CuCl_2 und NiCl_2 wieder sehr ausgeprägt. Zudem verhielt sich das Wachstum um FeSO_4 , Ammoniumeisencitrat und AgNO_3 um NaNO_3 wie bei der Überexpression von scr2736 (2oe). Im Gegensatz zu den vorhergehend beschriebenen Stämmen wuchs die Überexpression von scr2952 (29oe) nur um ZnSO_4 besser, nicht aber um ZnCl_2 .

Die Überexpression von scr3920 (3oe) zeigte das gleiche Wuchsverhalten wie die bisher getesteten Stämme. Auf SM zeigte sich nur ein Unterschied bei NiCl_2 , das Wachstum war sehr reduziert. Ein leicht schnelleres Wachstum war bei ZnCl_2 und ZnSO_4 zu sehen, da sich hier bereits Actinorhodintröpfchen bildeten. Ein sehr großer Hemmhof fand sich um CuCl_2 auf MM, ein etwas kleinerer um NiCl_2 , wobei auch hier am Rand des Hemmhofs ausnehmend gutes Wachstum mit Sporulation zu sehen war. Um FeSO_4 , Ammoniumeisencitrat, AgNO_3 sowie ZnSO_4 war das Wachstum ebenfalls gesteigert. Bei letzterem war auch sporulierendes Myzel zu sehen. NaNO_3 konnte auch hier keinen Effekt auslösen.

In Abbildung 3.32 sind Fotografien des Wachstums der vier weiteren Überexpressionsstämme auf Festmedium mit Metalllösungen dargestellt. Bei der Überexpression von scr4115 (41oe) induzierte keine der Lösungen ein verändertes Wachstum auf SM. Auf MM jedoch zeigte sich ein Hemmhof um CuCl_2 und NiCl_2 . Außerdem wuchsen die Zellen um FeSO_4 , Ammoniumeisencitrat, ZnSO_4 und ZnCl_2 schneller als auf dem Rest der Platte, wobei die beiden letztgenannten Lösungen einen größeren Radius verursachten.

Die Überexpression von scr4389 (43oe) verhielt sich ganz ähnlich wie die der sRNA scr4115. Lediglich auf SM zeigte sich ein Wuchsdefizit um NiCl_2 .

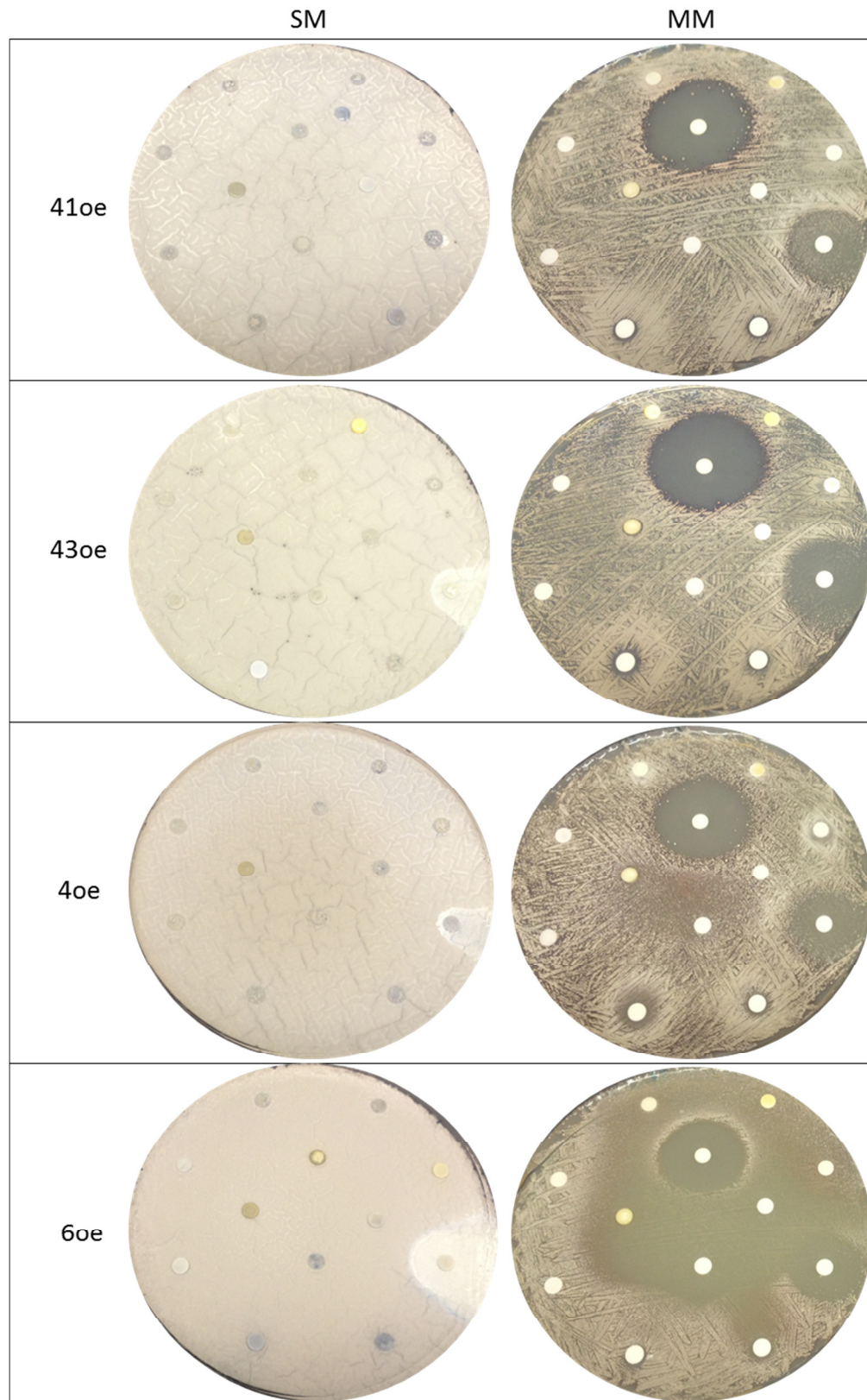


Abbildung 3.32: Phänotypensuche auf Festmedium unter Metallionenstress

Die Überexpressionsstämme der sRNAs scr4115 (41oe), scr4389 (43oe), scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) wurden vorgekeimt und auf Soja-Mannitol- (SM) und Minimalmedium (MM) ausgestrichen. Darauf wurden sterile Filterplättchen aufgelegt und auf jedes Filterplättchen je 5 µl einer Metalllösung getropft. Die Platten wurden für 10 d bei 28°C inkubiert. Auf welches Filterplättchen welche Lösung getropft wurde, ist in Tabelle 3.8 und Abbildung 3.30 verzeichnet. Als Referenz diente der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) (Abb. 3.31).

Die Überexpression von scr4632 (4oe) zeigte, wie die meisten Überexpressionen auf SM, nur den verlangsamten Wuchs um NiCl_2 . Auch das Wuchsverhalten auf MM ähnelte dem der anderen Stämme. Es gab kein Wachstum in den Hemmhöfen um CuCl_2 und NiCl_2 , erhöhtes Wachstum um FeSO_4 , sowie ZnCl_2 und ZnSO_4 . Das gesteigerte Wachstum um ZnCl_2 begann allerdings erst in ca. 4-5 mm Abstand zum Filterplättchen, nicht wie bei den anderen Stämmen direkt daran angrenzend.

Der Bereich um NiCl_2 , bei dem in fast allen Überexpressionsstämmen ein verlangsamtes Wachstum auftrat, war bei der Überexpression von scr6925 (6oe) am größten. Der Hemmhof um NiCl_2 auf MM war jedoch nicht größer als bei den anderen Stämmen. 6oe konnte auf MM mit den aufgelegten, getränkten Filterplättchen am schlechtesten wachsen. Nur um MnCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ und ZnCl_2 wuchsen die Zellen normal. Um ZnSO_4 war nur teilweise ein Wachstum zu sehen, ebenso entlang des Hemmhofes von CuCl_2 . Ein gesteigertes Wachstum konnte durch keine der Lösungen hervorgerufen werden.

Der Versuch hat gezeigt, dass verschiedene Metalle das Wachstum der Überexpressionsstämmen von *S. coelicolor* beeinflussen können. Es hat sich jedoch keine Veränderung ergeben, die explizit nur in einem der Stämme zu beobachten gewesen wäre und somit auf eine Wirkung einer spezifischen RNA zurückzuführen gewesen wäre.

3.6.2 Unterschiedliche Voll- und Minimalmedien

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss verschiedener Voll- und Minimalmedien auf das Wachstum der sRNA-Überexpressionen getestet werden. Der Versuch wurde viermal zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Das Schema der Anordnung der Stämme auf den Medien findet sich in Abbildung 3.33.

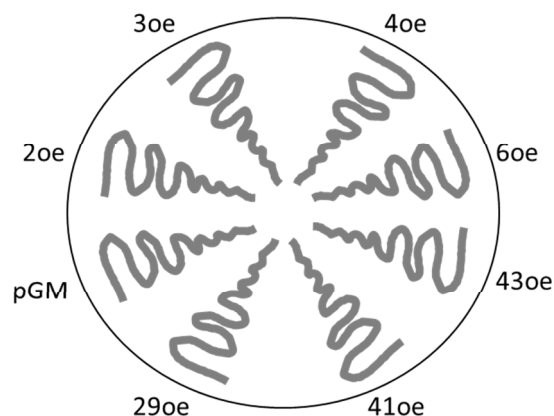


Abbildung 3.33: Auftragsschema der sieben sRNA-Überexpressionsstämmen auf unterschiedlichen Voll- und Minimalmedien

Ausgekeimte Sporen der sRNA-Überexpressionen von scr2736 (2oe), scr2952 (29oe), scr3920 (3oe), scr4115 (41oe), scr4389 (43oe), scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) sowie der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden auf verschiedene Voll- und Minimalmedien aufgetragen.

3.6.2.1 Analyse der sRNA-Überexpressionen auf Vollmedien

Es wurden vier verschiedene Vollmedien (SM, TSB, GYM und R2YE) über einen Zeitraum von 10 d getestet. Während TSB-Medium ausschließlich aus Soja bestand, wurde bei SM dem Sojabestandteil noch Mannitol hinzugefügt. Dem üblicherweise für Flüssigkulturen verwendeten

TSB-Medium wurde für die Nutzung als Festmedium 2% Agar hinzugefügt. GYM (Glucose, Hefeextrakt, Malzextrakt und Calciumcarbonat) und R2YE (Saccharose, Kaliumsulfat, Magnesiumchlorid, Glucose, Casaminoäuren und Hefeextrakt) enthielten keine Sojakomponente, dafür Hefeextrakt als komplexen Zusatz. Nach Ablauf dieser Testsequenz wurden die Platten fotografiert. Sie sind in Abbildung 3.34 zusammengefasst.

Bei den Festmedien-Platten von GYM und R2YE wurden jeweils zwei verschiedene Kohlenstoffquellen, Glucose und Glycerin, getestet. Glucose wurde verwendet, da es als einfacher Zucker bei verschiedensten Bakterienmedien als klassische Kohlenstoffquelle genutzt wird. Glycerin ist ein Zuckeralkohol und Bestandteil von Fettsäureestern, als Zwischenprodukt ist es an verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt. Zudem verfügt *S. coelicolor* über den Mechanismus der Katabolitrepression, den Glucose und Glycerin als Intermediate ansprechen können. (Hindle & Smith, 1994) Im Falle der Vollmedien GYM und R2YE wurden außerdem Platten ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle angefertigt, da durch die in GYM enthaltenen Hefe- und Malzextrakte und dem in R2YE vorkommenden Hefeextrakt beide Medien bereits sehr vollwertig waren. Da das TSB- und SM-Medium fast ausschließlich aus Soja bestanden, konnte bei diesen Vollmedien die Kohlenstoffquelle nicht variiert werden.

Auf SM war eine leicht beschleunigte Produktion von Actinorhodin in der Überexpression von scr2952 (29oe) zu sehen. Die anderen Stämme wuchsen sehr einheitlich. Auf TSB-Medium wuchsen alle aufgetragenen Stämme ebenfalls sehr gleichförmig, es war keine Abweichung zu erkennen.

Die Vollmedien GYM und R2YE wurden in drei Varianten getestet. Die Medien wurden ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (normalerweise wird dem Medium Glucose zugesetzt) und mit Glucose bzw. Glycerin als Kohlenstoffquelle verwendet. Insgesamt wuchsen alle Stämme auf den GYM-Varianten sehr gleichmäßig. Eine Ausnahme bildeten die Überexpressionen von scr2952 (29oe) und scr3920 (3oe), diese wuchsen weniger dicht als die anderen Stämme oder die Referenz pGM.

Die Variationen des R2YE-Vollmediums wiesen bis auf zwei Ausnahmen keine Unterschiede auf. Die Überexpressionen der sRNAs scr4115 (41oe) und scr43289 (43oe) produzierten im Gegensatz zu den anderen auf R2YE-Glucose-Medium aufgetragenen Stämmen etwas mehr Actinorhodin bzw. gaben dies auch an die Oberfläche des Zellgeflechts ab. Die übrigen Stämme produzierten auch Actinorhodin, gaben dies aber nur an das Medium ab und sekretierten es nicht an der Oberfläche.

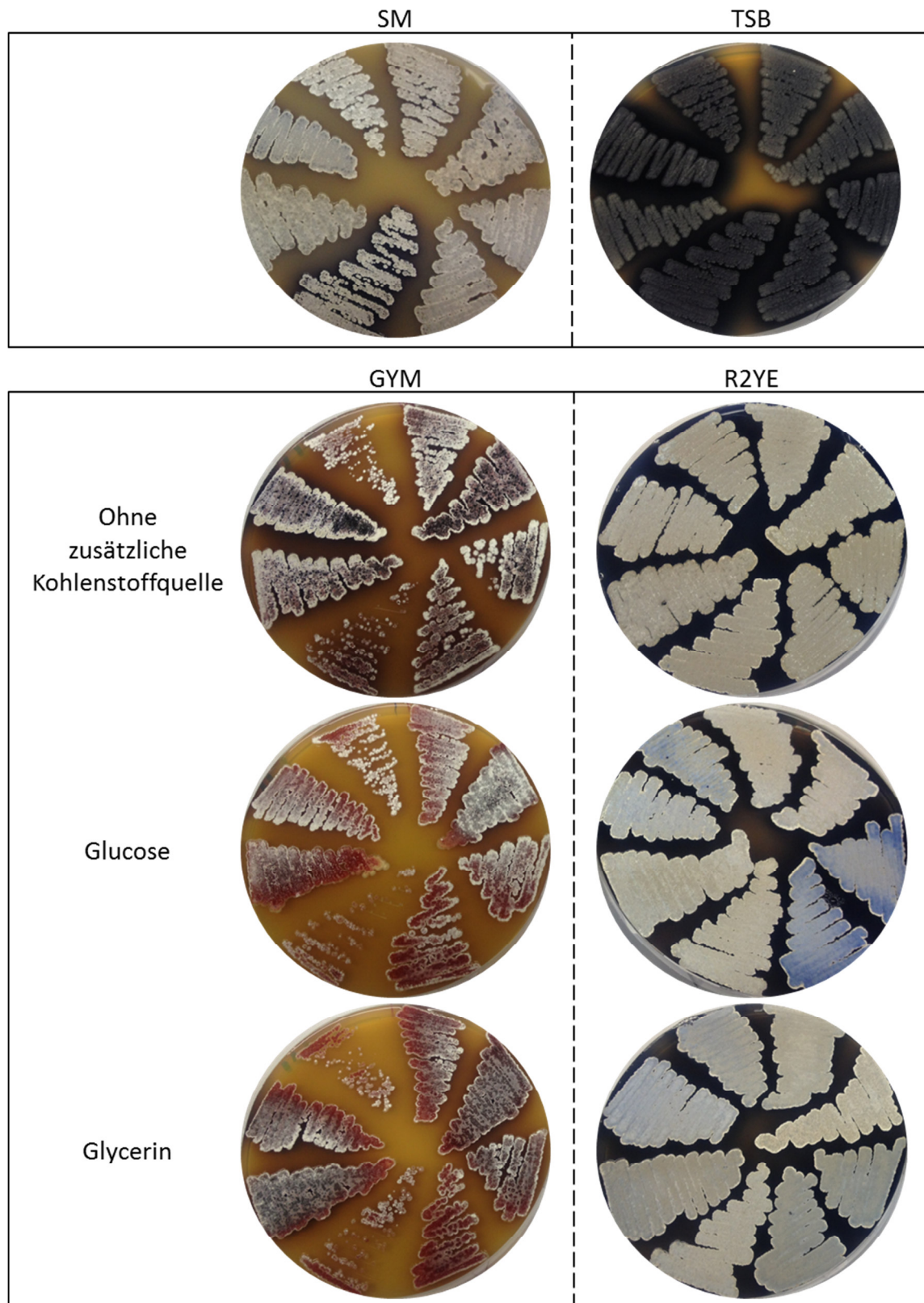


Abbildung 3.34: sRNA-Überexpressionsstämme auf verschiedenen Vollmedien

Der Referenzstamm des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) und die Überexpressionen von scr2736, scr2952, scr3920, scr4115, scr4389, scr4632 und scr6925 wurden als ausgekeimte Sporen auf vier Vollmedien aufgetragen. Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens wurden SM, TSB, GYM und R2YE verwendet. Die Vollmedien GYM und R2YE wurden in drei Varianten eingesetzt (ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, mit Glucose- und mit Glycerinzusatz). Abbildung 3.33 ist die Verteilung der Stämme auf dem Medium zu entnehmen. Die Zellen wurden für 96 h bei 28°C inkubiert.

3.6.2.2 Analyse der sRNA-Überexpressionen auf Minimalmedium

Die Überexpressionen aller sieben sRNAs und der Referenzstamm (Wildtyps mit Leerplasmid pGMs) wurden auf Minimalmedium mit Glucose oder Glycerin ausgestrichen (Abb. 3.35). Auf mit Glycerin supplementiertem Medium wuchsen alle acht Stämme ein wenig schneller als auf Medium mit Glucose-Zusatz. Andere Wuchsunterschiede waren nicht festzustellen.

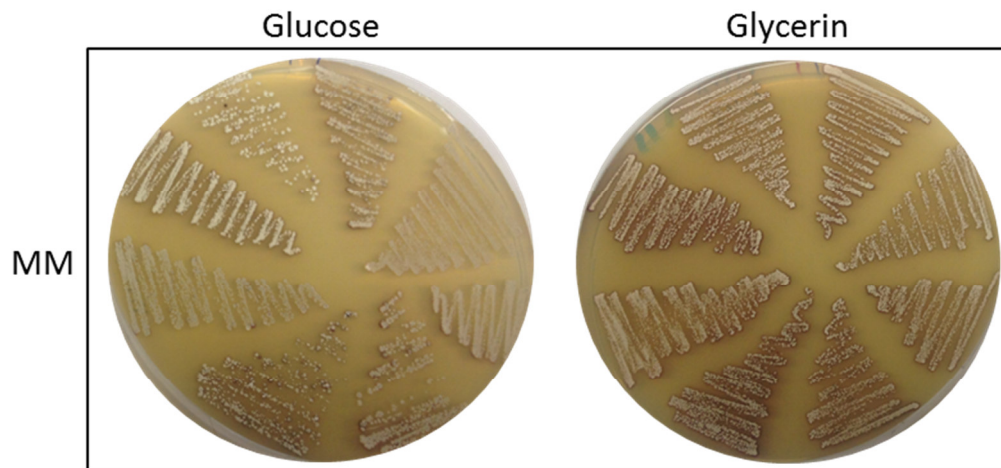


Abbildung 3.35: sRNA-Überexpressionen auf Minimalmedium

Die Überexpressionsstämme von scr2736, scr2952, scr3920, scr4115, scr4389, scr4632 und scr6925 sowie der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs wurden auf Minimalmedium mit Glucose bzw. Glycerin als Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Die Zellen wurden für 96 h bei 28°C inkubiert.

3.6.2.3 Analyse der sRNA-Überexpressionen auf Evans Minimalmedien

Evans Minimalmedium wird üblicherweise als Flüssigkultur verwendet. Für diesen Versuch wurde es durch den Zusatz von 2% Agar als Festmedium genutzt. Das Medium wurde in verschiedenen Zusammensetzungen als Balanced-Medium, Kohlenstoff-limitiert, Stickstoff-limitiert und Phosphat-limitiert verwendet. In Evans Balanced-Medium liegen Glucose, Natriumnitrat und Natriumhydrogenphosphat in ausgeglichener Menge vor. Für die jeweiligen Limitationen wurden diese Komponenten einzeln angepasst (Tab. 5.5). In Abbildung 3.36 sind die angefertigten Fotografien der Stämme nach Inkubationsende zusammengefasst.

Die auf Evans Minimalmedium (Balanced) mit supplementiertem Glycerin ausgestrichenen sRNA-Überexpressionsstämme und der Referenz des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) wuchsen etwas schneller als die auf Evans Minimalmedium mit zugefügter Glucose ausgestrichenen Zellen. Die Überexpressionen von scr2736 (2oe), scr4632 (4oe), scr6925 (6oe) und scr2952 (29oe), zeigten zudem eine vermehrte Produktion von Actinorhodin, zu erkennen an der dunklen Einfärbung des Mediums (Abb. 3.36 A).

Auch Zellen, die auf Kohlenstoff-limitiertem Evans Minimalmedium ausgestrichen wurden, wuchsen bei Zugabe von Glycerin zum Medium schneller als bei Zugabe von Glucose. Bei diesen beiden Medien waren keine Unterschiede zwischen den Überexpressionen zu sehen, auch nicht in der Produktion von Actinorhodin (Abb. 3.36 B).

Phosphat-limitiertes Evans Minimalmedium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle induzierte ebenfalls ein schnelleres Wachstum in allen Stämmen (Abb. 3.36 C). Wurde Glucose als Kohlenstoffquelle hinzugefügt, reagierten die Überexpressionen von scr2736 (2oe), scr4632 (4oe), scr6925 (6oe), scr2952 (29oe) sowie die Referenz (pGM) mit verstärkter Actinorhodinproduktion.

Stickstoff-limitiertes Evans Minimalmedium zeigte gleichfalls ein schnelleres Wachstum der Stämme, wenn dem Medium Glycerin zugefügt war. Unter Glucose-Zugabe wiesen nur die Überexpressionen von scr2736 (2oe) und scr6925 (6oe) eine etwas erhöhte Produktion von Actinorhodin auf. In beiden Medien wuchsen die Zellen des Überexpressionsstamms von scr2952 (29oe) sehr schlecht. Die Zellen wurden nicht annähernd so dicht wie bei den übrigen Stellen, zudem blieben die Kolonien kleiner und eine Actinorhodinproduktion wurde nicht induziert. Die Zellen des Überexpressionsstamms von scr4115 (41oe) wuchsen ähnlich schlecht, allerdings nur auf Stickstoff-limitiertem Medium mit supplementierter Glucose (Abb. 3.36 D).

Das Wachstum der Überexpressionsstämme hat im Wesentlichen keine großen Veränderungen gezeigt. Alle Stämme wuchsen etwas besser auf Medium mit enthaltenem Glycerin, aber keine der Überexpressionen trat hier besonders in den Vordergrund. Gleiches gilt für die unterschiedliche Produktion von Actinorhodin. Einige Stämme zeigten eine variierende Actinorhodinmenge, aber kein Stamm zeigte sich als besonders oder einzigartig in seiner Actinorhodin-Varianz.

Die Überexpression von scr2952 stellte sich als am interessantesten heraus. Im Vollmedium GYM wie auch in Stickstoff-limitiertem Evans-Medium wies sie ein Wuchsdefizit auf. Auf SM, Evans Balanced und Phosphat-limitiertem Evans-Medium war im Vergleich zu den anderen Stämmen eine erhöhte Actinorhodinproduktion zu erkennen. Vergleicht man dies mit der Referenz pGM, kann man auf einen durch die Überexpression der sRNA induzierten Effekt schließen.

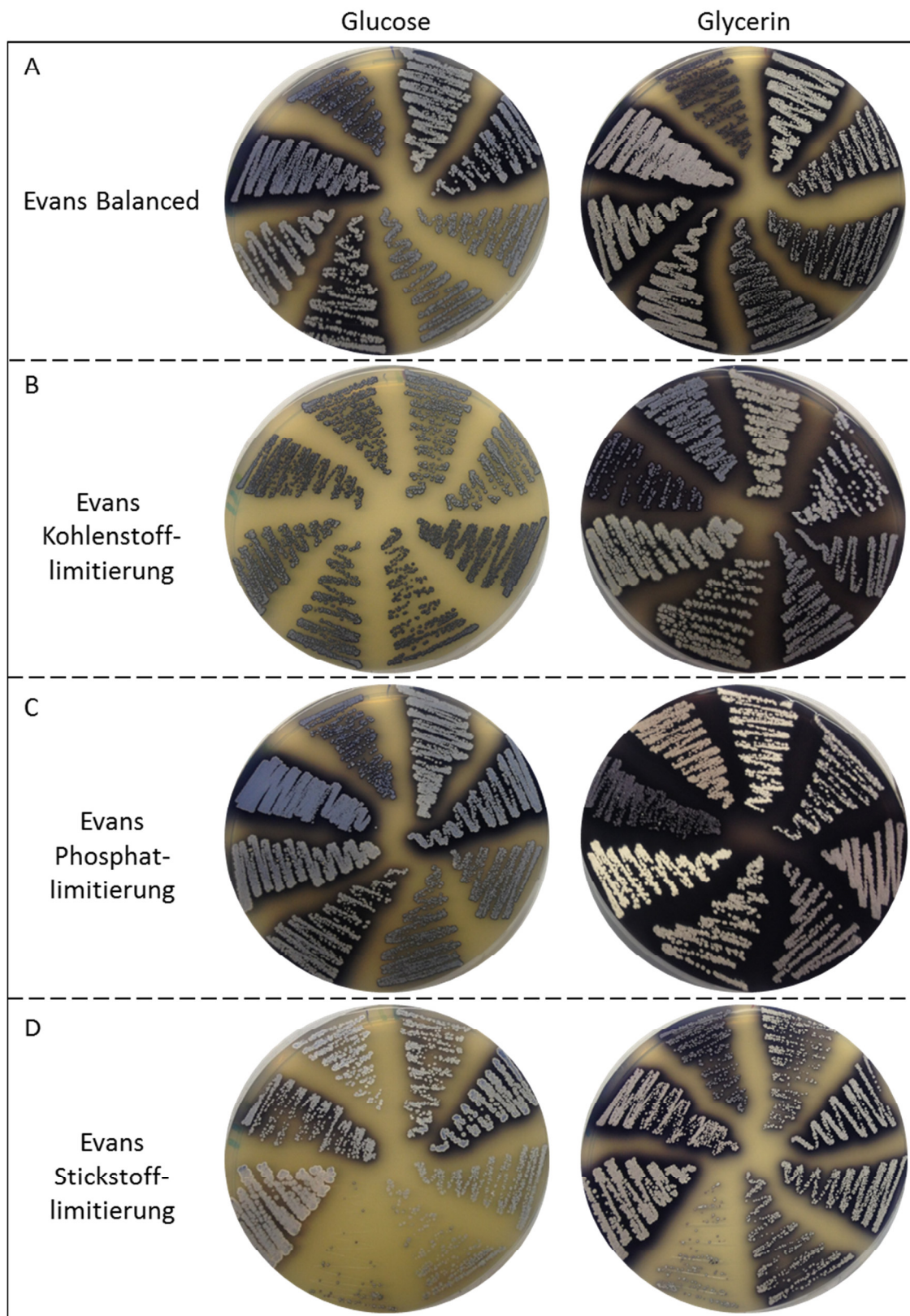


Abbildung 3.36: sRNA-Überexpressionen auf Evans Minimalmedien unterschiedlicher Nährstoff-Zusammensetzungen

Die Überexpressionen von scr2736, scr2952, scr3920, scr4115, scr4389, scr4632 und scr6925 und der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs wurden vorgekeimt und auf verschiedene Evans Minimalmedien ausgestrichen. Es handelte sich um Evans Balanced, Evans Kohlenstoff-limitiert, Evans Phosphat-limitiert und Evans Stickstoff-limitiert. Jedes Medium wurde jeweils mit Glucose bzw. Glycerin als Kohlenstoffquelle angefertigt. Die Zellen wurden für 96 h bei 28°C inkubiert.

3.6.3 Einfluss verschiedener Nährstofflösungen auf das Wachstum von *S. coelicolor*

In der folgenden Testreihe wurden die Überexpressionen der sRNAs scr2736 (2oe), scr2952 (29oe) und scr6925 (6oe) sowie der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) für die Untersuchung des Wachstums bei Supplementierung mit unterschiedlichen Nährstofflösungen herangezogen. Auf eine Analyse der anderen Überexpressionen wurde verzichtet, da keine Beeinflussung auf den verschiedenen Voll- und Minimalmedien zu beobachten war.

Für diesen Test wurden Glucose, Glucose-6-Phosphat, Fructose, Fructose-6-Phosphat, Glycerin, N-Acetylglucosamin, Galactose, Citrat und MEM-Casaminosäuren verwendet.

Die drei Überexpressionsstämme von scr2736 (2oe), scr2952 (29oe) und scr6925 (6oe) und der Referenzstamm pGM wurden vorgekeimt und flächig auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Dann wurden sterile Filterplättchen auf das Medium aufgelegt und mit je 5 µl einer Lösung (alle Nährstofflösungen waren in 10%iger Konzentration angesetzt) betropft. Die Platten wurden anschließend für 10 d inkubiert. Aus Tabelle 3.9 und Abbildung 3.37 sind die verwendeten Lösungen und deren Verteilung auf dem Medium zu entnehmen.

Tabelle 3.9: Lösungen zur Überprüfung des Wachstums bei Zugabe von verschiedenen Nährstoffen

Abbildung	Filter	Nährstofflösung
3.38	1	Glucose
	2	Glucose-6-Phosphat
	3	Fructose
	4	Fructose-6-Phosphat
	5	Glycerin
	6	N-Acetylglucosamin
	7	Galactose
	8	Citrat, pH 1
	9	MEM-Casaminosäuren
3.40	1-7	s.o.
	8	MEM-Casaminosäuren
	9	Citrat, pH 1
	10	Citrat, pH 6,2; in MQ
	11	Citrat, pH 6,2; in Tris

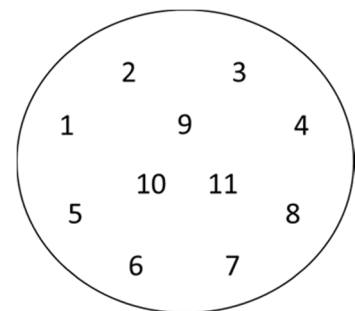


Abbildung 3.37: Schema der Verteilung der Filterplättchen für die Auftragung von Nährstofflösungen auf das Festmedium

Für die Überprüfung des Wachstums wurden der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie die Überexpressionen von scr2736 (2oe), scr6925 (6oe) und scr2952 (29oe) bei Zugabe von diversen Nährstofflösungen als Kohlenstoffquelle überprüft. Auf das Medium wurden Filterplättchen gelegt und darauf 5 µl der in Tabelle 3.9 aufgeführten Lösungen getropft. Die Auftragung und Nummerierung variiert leicht in den Abbildungen 3.38 und 3.39.

Es fällt auf, dass die Platten trotz des Fehlens einer Kohlenstoffquelle im Medium (es wurde keine Glucose zugegeben) komplett bewachsen waren. *S. coelicolor* besitzt eine Agarase, die es ihm erlaubt, den zur Festigung des Mediums verwendeten Agar als Kohlenstoffquelle zu nutzen. (Buttner *et al.*, 1987) Minimalmedien-Platten ohne Kohlenstoffquelle zeigten daher immer ein

bestimmtes Level an Hintergrundwachstum. Dieser unerwünschte Nebeneffekt sollte ausgeschlossen werden, indem der Gelbildner Gelrite® anstelle des Agars verwendet wurde. Ohne Kohlenstoffquelle und Agar war ein Zellwachstum wie erwartet nicht möglich. Ein Wachstum konnte jedoch auch nicht stattfinden, wenn dem mit Gelrite® verfestigten Medium direkt Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurden. Auch die Supplementierung einer Kohlenstoffquelle über die aufgelegten Filterplättchen konnte unter Anwendung von Gelrite® kein Wachstum induzieren.

Der Referenzstamm pGM und die Überexpression von sc2736 (2oe) zeigten jeweils ein reduziertes Wachstum bei der Zugabe von Glucose und N-Acetylglucosamin (Abb. 3.38). Es verwundert, dass ausgerechnet bei der gängigsten aller Kohlenstoffquellen (Glucose) und der für Streptomycceten üblichen Ressource N-Acetylglucosamin das Wachstum vermindert war. N-Acetylglucosamin wird von den Zellen selbst für ihre Zellwand assimiliert, beim Übergang vom vegetativen Myzel zum Luftmyzel abgebaut und als neues Substrat verwendet. Bei pGM sieht man zusätzlich ein gesteigertes Wachstum um Glycerin. Es konnte bereits in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass *S. coelicolor* bei Zugabe von Glycerin schneller wächst als in vergleichbarem Medium mit anderer Kohlenstoffquelle.

Bei der Überexpression von scr6925 (6oe) konnte man für Glucose und N-Acetylglucosamin ein etwas langsames Wachstum feststellen. Dieser Effekt war allerdings sehr gering und nur schwer zu erkennen.

Die Überexpression von scr2952 (29oe) hingegen zeigte ein sehr eindeutiges Bild. Das Wachstum des Stammes war um Glucose und N-Acetylglucosamin stark vermindert. Bei Glycerin und Galactose war das Wachstum ebenfalls reduziert, was jedoch von den benachbarten Lösungen induziert gewesen sein könnte. Der hervorstechendste Effekt ließ sich mit Citrat erzielen. Hier wuchsen die Zellen sehr stark, zu erkennen am dichten, grauen Ring um Filterplättchen Nummer 8. Sie entwickelten sich hier zudem sehr viel feiner, was für eine gute Nährstoffversorgung spricht. Die Überexpression von scr2952 (29oe) neigte dazu, bei nicht optimaler Nährstofflage vereinzelter und in groben Kolonien zu wachsen (vgl. hierzu Abb. 3.31). Zu beachten ist, dass die Zellen nicht unmittelbar am Filterplättchen dicht und schnell wuchsen, sondern erst ca. 4 mm vom Filter entfernt.

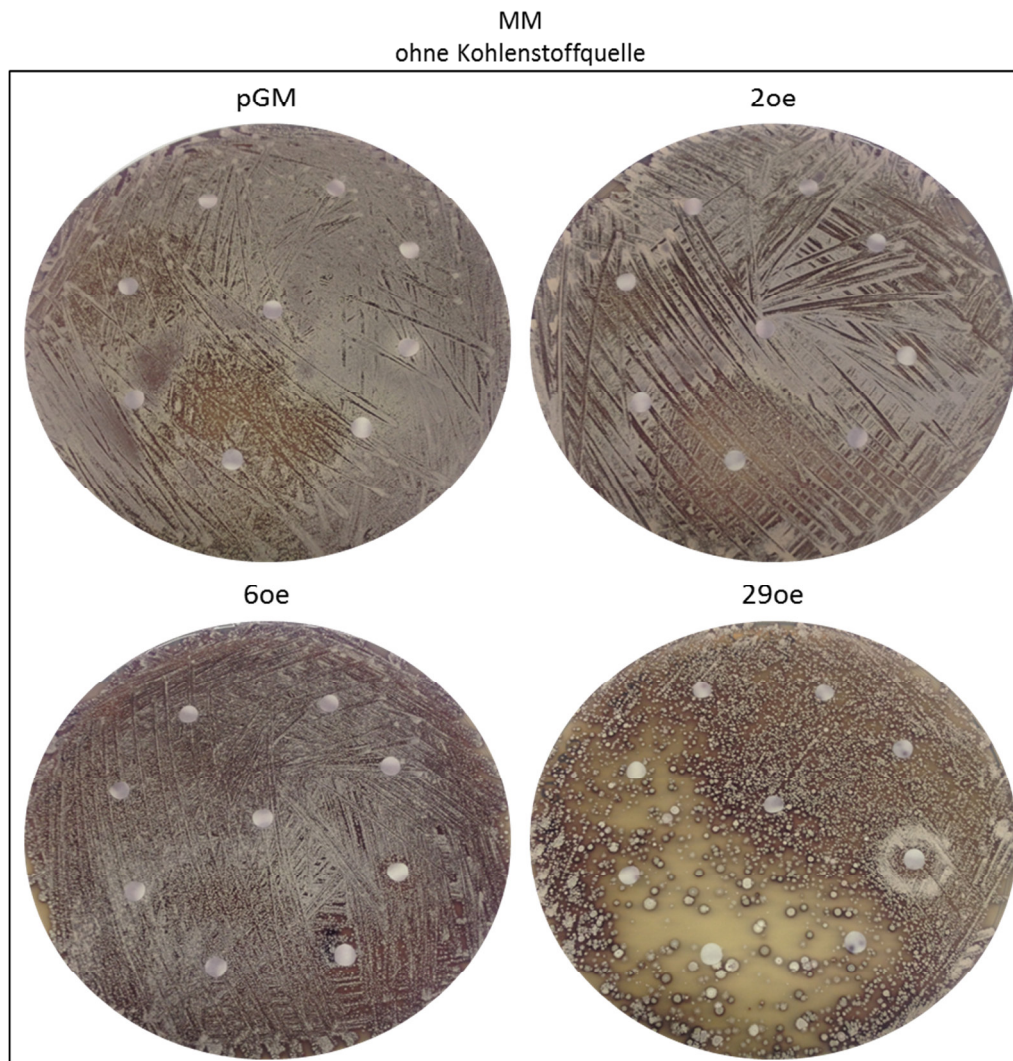


Abbildung 3.38: Analyse des Wachstumsverhaltens von drei sRNA-Überexpressionen bei Zugabe von verschiedenen Stoffwechselintermediaten

Der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) und die Überexpressionen von scr2736 (2oe), scr6925 (6oe) und scr2952 (29oe) wurden flächig auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) ausgestrichen und sterile Filterplättchen auf die Oberfläche gelegt. Je 5 µl einer 10%igen Nährstofflösung wurden auf die Filterplättchen getropft. Art und Verteilung der Substanzen sind Tabelle 3.9 oben und Abbildung 3.37 zu entnehmen.

3.6.4 Einfluss von Citrat auf die Überexpression von scr2952

3.6.4.1 Einfluss von Citrat und pH-Wert

Die Überexpression der sRNA scr2952 (29oe) reagierte als eine der wenigen Überexpressionen auf verschiedene Festmedien. Sie zeigte reduziertes Wachstum auf dem Vollmedium GYM und Evans Minimalmedium mit Stickstofflimitierung. Außerdem reagierten die Zellen des Überexpressionsstamms von scr2952 (29oe) mit gesteigerter Actinorhodinproduktion auf dem Vollmedium SM und den beiden Minimalmedien Evans Balanced und Evans Phosphat-limitiert. Bei der Überprüfung verschiedener Nährstofflösungen reagierte sie mit sehr eindeutig gesteigertem Wachstum auf die Zugabe von Citrat, welches als 10%ige Lösung supplementiert wurde. Dies korrespondierte mit der Beobachtung, dass die Überexpression von scr2952 (29oe) auch auf die Supplementierung mit Ammoniumeisencitrat reagierte. Besonders unterstrichen wurde diese Verbindung durch die Tatsache, dass *S. coelicolor* nicht freies Citrat aufnimmt, sondern Komplexe

mit Metallen bildet (vornehmlich Eisen) und diese über Transporter aufnimmt. (Lensbouer *et al.*, 2008)

Nachdem es einen so enormen Effekt auf das Wachstum der Zellen des Überexpressionsstamms hatte, wurde bei der Reproduktion dieser Wirkung ein pH von 1 der Citrat-Lösung festgestellt. Dies passte zur Beobachtung, dass die Zellen nicht in unmittelbarer Nähe vom Filterplättchen wuchsen, sondern mit einem Abstand von ca. 4 mm. In diesem Bereich hatte sich der pH-Wert durch die Diffusion im Medium bereits abgeschwächt.

Da nicht eindeutig war, ob das Citrat oder der niedrige pH-Wert Auslöser für den Wuchseffekt waren, wurde der Versuch mit der ursprünglichen Lösung (I) und mit zwei Vergleichslösungen, deren pH-Wert auf pH 6,2 eingestellt war, wiederholt. Die Citrat-Lösungen wurden einmal in Wasser angesetzt und mit NaOH auf pH 6,2 eingestellt (II). Lösung III wurde in 1 M Tris gelöst und dann der pH-Wert mit NaOH eingestellt. Mit in 1 M Tris gelöstem Citrat sollte eine größere Pufferkapazität der Lösung auf dem Festmedium erreicht werden. Weder die in Wasser gelöste Citrat-Lösung noch die gepufferte in 1 M Tris aufgenommene Lösung konnten auf einen anderen pH-Wert als 6,2 eingestellt werden.

Die drei Citrat-Lösungen (I, II und III) wurden auf Filterplättchen getropft, die auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle lagen. Die Beeinflussung des Referenzstammes pGM und der Überexpression von scr2952 (29oe) wurde getestet. pGM zeigte nur in der Mitte des Mediums bei Citrat-Lösung II mit pH 6,2 ein verstärktes Wachstum. Das Wachstum um alle anderen Filterplättchen war auf Hintergrundniveau. Die Platten sind in Abbildung 3.39 dargestellt.

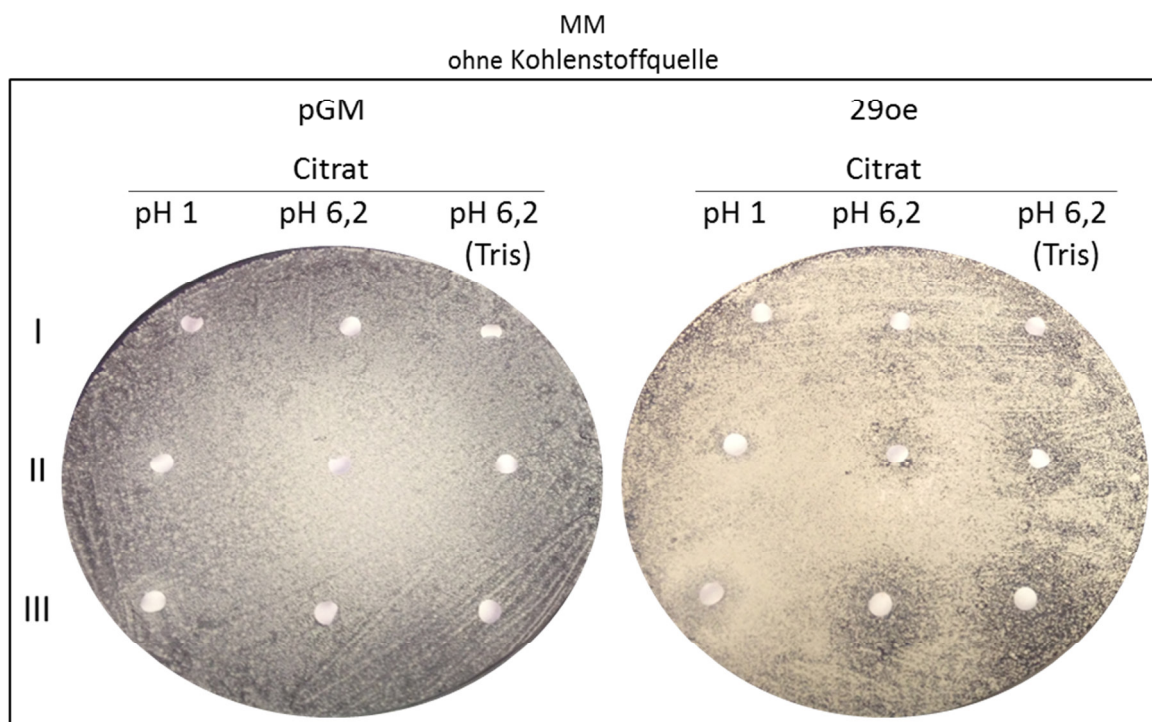


Abbildung 3.39: Überprüfen der Auswirkungen des pH-Werts der Citratlösung

Auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) wurden der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) als Referenz und die Überexpression von scr2952 (29oe) ausgestrichen. Auf die Zellen wurden Filterplättchen gelegt und je 5 µl 10%iges Citrat in MQ (pH 1 und pH 6,2) sowie in Tris (pH 6,2) aufgetropft. Die Lösung I war die ursprünglich angesetzte Lösung, die Lösungen II und III wurden neu angesetzt.

Die Überexpression von scr2952 (29oe) zeigte auf der ganzen linken Seite, dort wo die pH 1-Lösungen auf die Plättchen getropft worden waren, ein verstärktes Wachstum. Besonders stark zeigte sich dies bei den frisch angesetzten Citrat-Lösungen II und III. Hier war ebenfalls ein ringförmiges Wachstum um das Filterplättchen wie im Ausgangsversuch zu sehen. Die Lösungen mit pH 6,2 verursachten einen leichten (Lösung I) bis stärkeren (Lösung III) Hemmhof rund um die Filterplättchen. Für die weiteren Versuche wurde das Set der Citrat-Lösungen III verwendet.

Der Versuch zur Einwirkung verschiedener Nährstofflösungen auf den Organismus (Abb. 3.38) wurde mit dem Deletionsstamm von scr2952 (29del) wiederholt. Als Referenz für die Deletion wurde der Wildtyp (WT) von *S. coelicolor* (ohne Leerplasmid) verwendet. Die auf pH 6,2 eingestellten Citratlösungen wurden neben der Lösung mit pH 1 mitgeführt. Die Verteilung der Nährstoff-Lösungen auf dem Medium sind Tabelle 3.9 unten und Abbildung 3.37 zu entnehmen. Die fotografische Dokumentation des Mediums ist in Abbildung 3.40 dargestellt.

Der Wildtyp zeigte eine leichte Erhöhung des Wachstums bei allen drei Citrat-Lösungen. Die anderen Lösungen (Glucose, Glucose-6-Phosphat, Fructose, Fructose-6-Phosphat, Glycerin, N-Acetylglucosamin, Galactose und MEM-Casaminosäuren) beeinflussten das Wachstum nicht. Bei der Deletion von scr2952 (29del) induzierte Glucose, wie bei den anderen getesteten Stämmen, ein abgeschwächtes Wachstum, während Glycerin es steigerte. Bei N-Acetylglucosamin jedoch war das Wachstum um den Filter leicht erhöht, man erkennt gut den kreisförmigen Radius um dieses Plättchen herum.

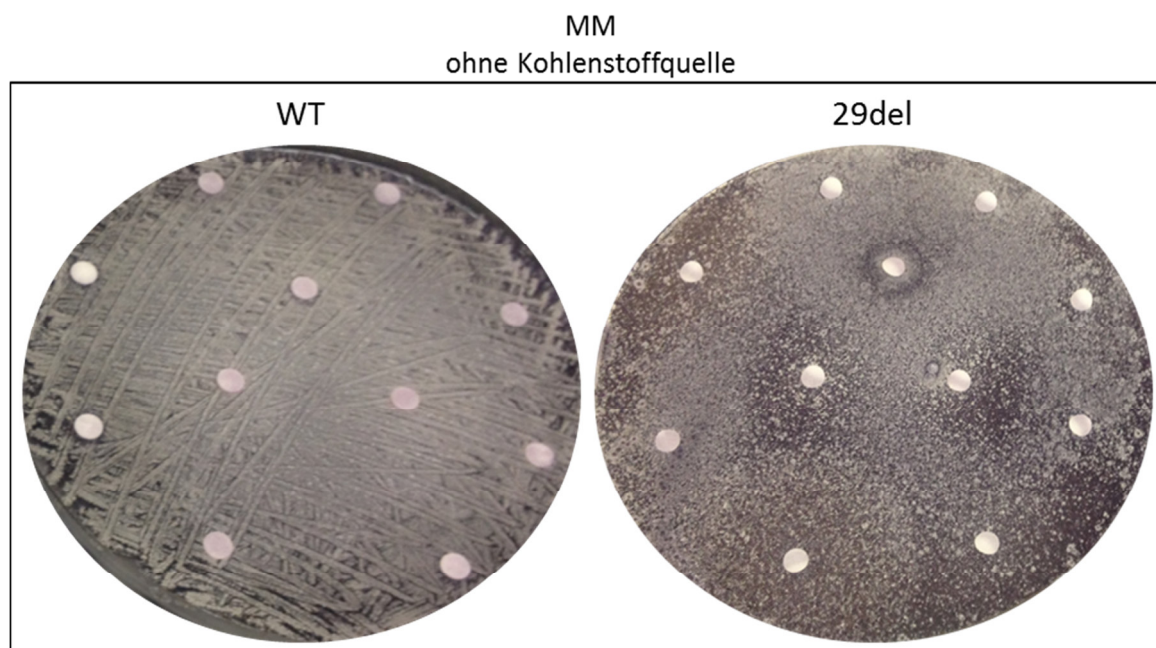


Abbildung 3.40: Analyse des Wuchsverhaltens der Deletion von scr2952 bei Zugabe von verschiedenen Stoffwechselintermediaten

Der Deletionsstamm von scr2952 (29del) wurde auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) ausgestrichen. Als Referenz wurde der Wildtyp (WT) verwendet. Filterplättchen wurden auf das Medium gelegt und je 5 µl der in Tabelle 3.9 unten aufgeführten Lösungen aufgetropft. Die Verteilung ist Abbildung 3.37 zu entnehmen.

Citrat löste bei der Deletion von scr2952 (29del) ein ringförmiges Wachstum um das Filterplättchen aus. Allerdings zeigte sich hier direkt am Filter das Wachstum von Zellen,

anschließend in einem Ring um das Plättchen kein und dann erneut ein erhöhtes Wachstum. Die Citrat-Wirkung der Überexpression von scr2952 (29oe) ist im Deletionsstamm somit genau umgekehrt. Die auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellten Citrat-Lösungen bewirkten einen Hemmhof mit reduziertem Wachstum.

3.6.4.2 Citrat-Effekt von scr2952 und die Abhängigkeit von Nährstoff oder pH-Wert

Nachdem sowohl in der Überexpression von scr2952 (29oe) als auch in der Deletion (29del) ein Effekt durch eine Citrat-Lösung mit pH 1 beobachtet werden konnte, musste geprüft werden, ob es sich hierbei um einen Effekt der Substanz Citrat oder allein des pH-Wertes handelte. Hierzu wurde der Versuch mit den Substanzen Malat, Oxalacetat, Pyruvat und Acetyl-CoA, die Citrat als Intermediate des Citrat-Zyklus umgeben, bzw. mit Pyruvat und Acetyl-CoA als Vorstufe des Stoffwechselweges wiederholt.

In Tabelle 3.10 sind die verwendeten Lösungen von Malat, Oxalacetat und Citrat sowie deren pH-Wert verzeichnet, aus Abbildung 3.41 kann die Verteilung der Lösungen auf dem Medium entnommen werden. Die Lösungen wurden auch hier wieder in Wasser (MQ) und 1 M Tris angesetzt.

Tabelle 3.10: Nährstofflösungen verschiedener pH-Werte zur Überprüfung der Wirkung des pH-Wertes auf den Wuchs der Überexpression und Deletion von scr2952

Filter	Nährstofflösung	Lösungsmittel	pH-Wert
1	5% Malat	MQ	1
2	5% Malat	MQ	6
3	5% Malat	Tris	2,5
4	5% Malat	Tris	6,2
5	5% Oxalacetat	MQ	1
6	5% Oxalacetat	MQ	5,8
7	5% Oxalacetat	Tris	1,5
8	5% Oxalacetat	Tris	6
9	10% Citrat	MQ	1
10	10% Citrat	MQ	6,2
11	10% Citrat	Tris	6,2

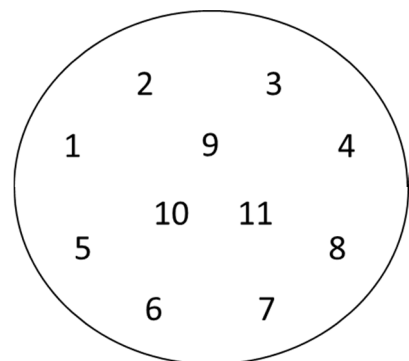


Abbildung 3.41: Schema der Filterplättchen-Verteilung auf dem Festmedium

Auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle wurden die Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) sowie die Referenzstämme des Wildtyps (WT) und Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) flächig ausgestrichen, sterile Filterplättchen aufgelegt und dann 5 µl der in Tabelle 3.10 aufgeführten Lösungen auf die Filter getropft.

Der Referenzstamm der Überexpressionen (Wildtyp mit Leerplasmid (pGM)), reagierte auf keine der Lösungen von Malat oder Oxalacetat, unabhängig vom pH-Wert. Ein etwas dichter Bewuchs ließ sich jedoch in der Mitte der Platte in der Nähe der Citrat-Lösungen feststellen. Die Überexpression von scr2952 (29oe) reagierte wie in den vorhergehenden Versuchen mit erhöhtem, rundem Wachstum bei Citrat, pH 1 und vermindertem Wuchs bei Citrat, pH 6,2 (in MQ und Tris). Von den weiteren hier getesteten Lösungen induzierte nur Oxalacetat, pH 1 in MQ einen Effekt mit ringförmig erhöhtem Wachstum der Überexpression von scr2952 (29oe) rund um das entsprechende Filterplättchen (Abb. 3.42).

Der Wildtyp (WT) zeigte das gleiche Wachstumsverhalten wie pGM. Bei der Deletion von scr2952 (29del) lösten Malat (in MQ, pH 6 sowie in Tris, pH 2,5 und 6,2) und Oxalacetat (in MQ, pH 1 und in Tris, pH 6) ein reduziertes Wachstum aus. Das in MQ gelöste Malat und Oxalacetat mit pH 1 und in Tris gelöstes Oxalacetat mit pH 1 induzierten keine Wachstumsänderung. Citrat mit pH 6,2 verursachte, sowohl in MQ als auch in Tris, einen Hemmhof, während der Befund für die Lösung mit pH 1 nicht eindeutig war. Es entstand hier kein Ring mit erhöhtem Wuchs um den Filter, vielmehr wuchsen Zellen im Bereich unterhalb des Filters, nicht aber oberhalb. Diese Wuchsreduzierung könnte auf den Einfluss des hemmenden Malats (Filter 2 und 3) zurückzuführen sein.

Besonders an der Deletion von scr2952 (29del) konnte man sehen, dass der pH-Wert für das Wachstum eine Rolle spielte. Alle angesetzten Lösungen mit einem pH über 5,8 verminderten den Wuchs der Zellen (Tabelle 3.10). Die Lösungen mit pH 1-1,5 steigerten das Wachstum zwar nicht, die Zellen konnten aber zumindest wachsen. In Tris gelöstes Malat mit pH 2,5 stellte eine Ausnahme dar, hier war das Wachstum der Deletion von scr2952 (29del) gemindert.

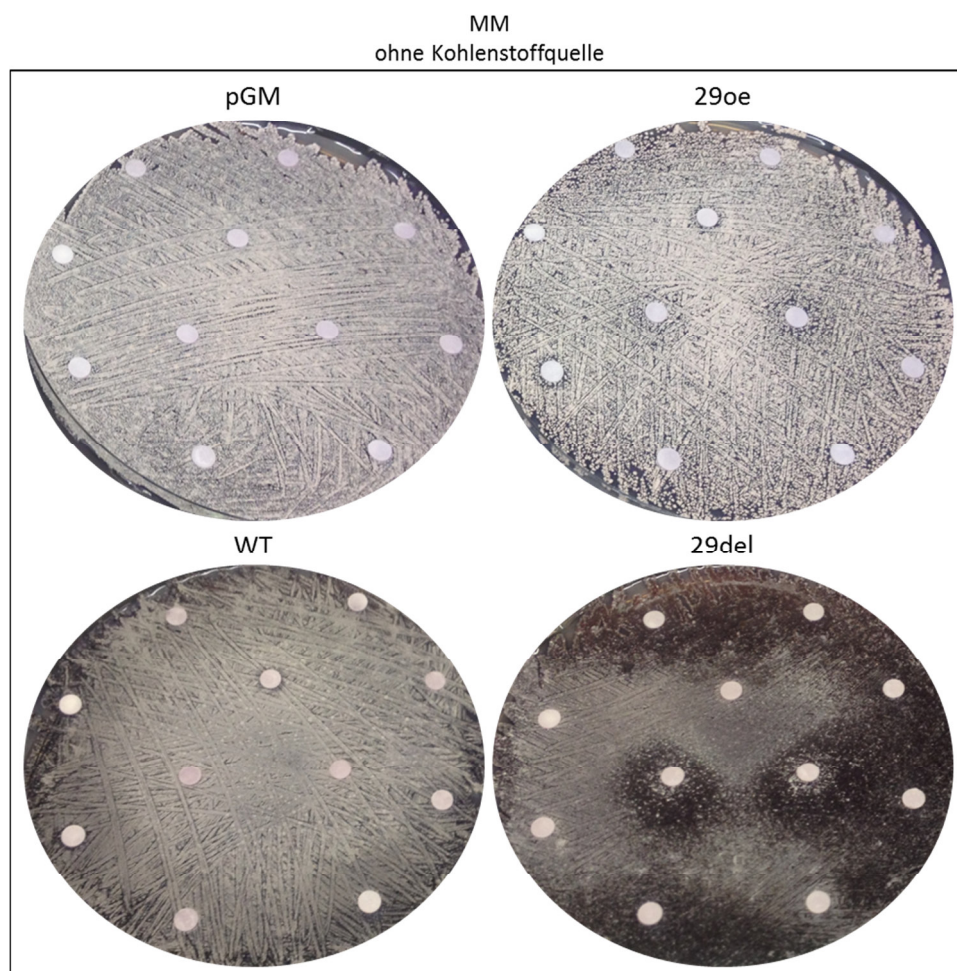


Abbildung 3.42: Wachstumsverhalten der Überexpressions- und Deletionsmutante von scr2952 mit Malat, Oxalacetat und Citrat verschiedener pH-Werte

Die Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) sowie die Referenzstämme Wildtyp (WT) und Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) ausgestrichen. Auf dem Medium aufgelegte Filter wurden mit Malat, Oxalacetat und Citrat verschiedener pH-Werte betropft. Die verwendeten Lösungen und deren Nummerierung sind Tabelle 3.10, die Verteilung auf dem Medium ist Abbildung 3.41 zu entnehmen.

Weiterhin wurde das Wuchsverhalten von Überexpression und Deletion von sc2952 (29oe bzw. 29del) mit den Zusätzen Pyruvat und Acetyl-CoA getestet. Die verwendeten Lösungen sind Tabelle 3.11 zu entnehmen, die Verteilung auf den Medien Abbildung 3.43.

Tabelle 3.11: Nährstofflösungen zur Überprüfung des Wuchses von Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del)

Filter	Nährstofflösung	Lösungsmittel	pH-Wert
1	10% Acetyl-CoA	MQ	1
2	10% Pyruvat	MQ	1
3	10% Pyruvat	MQ	1
4	10% Citrat	MQ	1
5	10% Citrat	MQ	6,2
6	10% Citrat	Tris	6,2

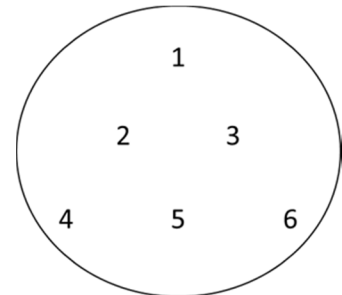


Abbildung 3.43: Schema der Filterplättchen auf Minimalmedium

Die Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) sowie die Referenzstämme des Wildtyps (WT) und Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle ausgestrichen, Filterplättchen aufgelegt und darauf 5 µl der in Tabelle 3.11 aufgelisteten Lösungen getropft.

Der Referenzstamm pGM wuchs auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle besonders gut, das Hintergrundwachstum war bereits sehr dicht. Um die Filterplättchen mit aufgetropftem Pyruvat, pH 1 und Citrat, pH 1 bildete sich ein schmaler Ring, in dem keine Zellen wuchsen. Dieses Phänomen ist mit einem richtigen Hemmhof aber nicht gleichzusetzen.

Die Überexpression von sc2952 (29oe) wuchs um das Filterplättchen mit Acetyl-CoA etwas dichter als auf dem Rest der Platte. Um Pyruvat, pH 1 und Citrat, pH 1 zeigte sich der schon beobachtete Ring, welcher direkt um das Filterplättchen keinen Wuchs hatte, in etwa 4 mm Abstand aber sehr dichtes Zellwachstum aufwies. Auf pH 6,2 eingestelltes Citrat (in MQ und Tris) zeigte wieder einen Hemmhof (Abb. 3.44).

Die aufgetropften Lösungen hatten keinerlei Einfluss auf das Wachstum des Wildtyps (WT). Die Deletion der sRNA scr2952 (29del) zeigte ein enorm gesteigertes Wachstum bei der Supplementierung mit Pyruvat, pH 1. Der Auftrag aller Citrat-Lösungen (pH 1 und 6,2 in MQ oder Tris gelöst) führte zu einem deutlichen Hemmhof um die jeweiligen Filterplättchen.

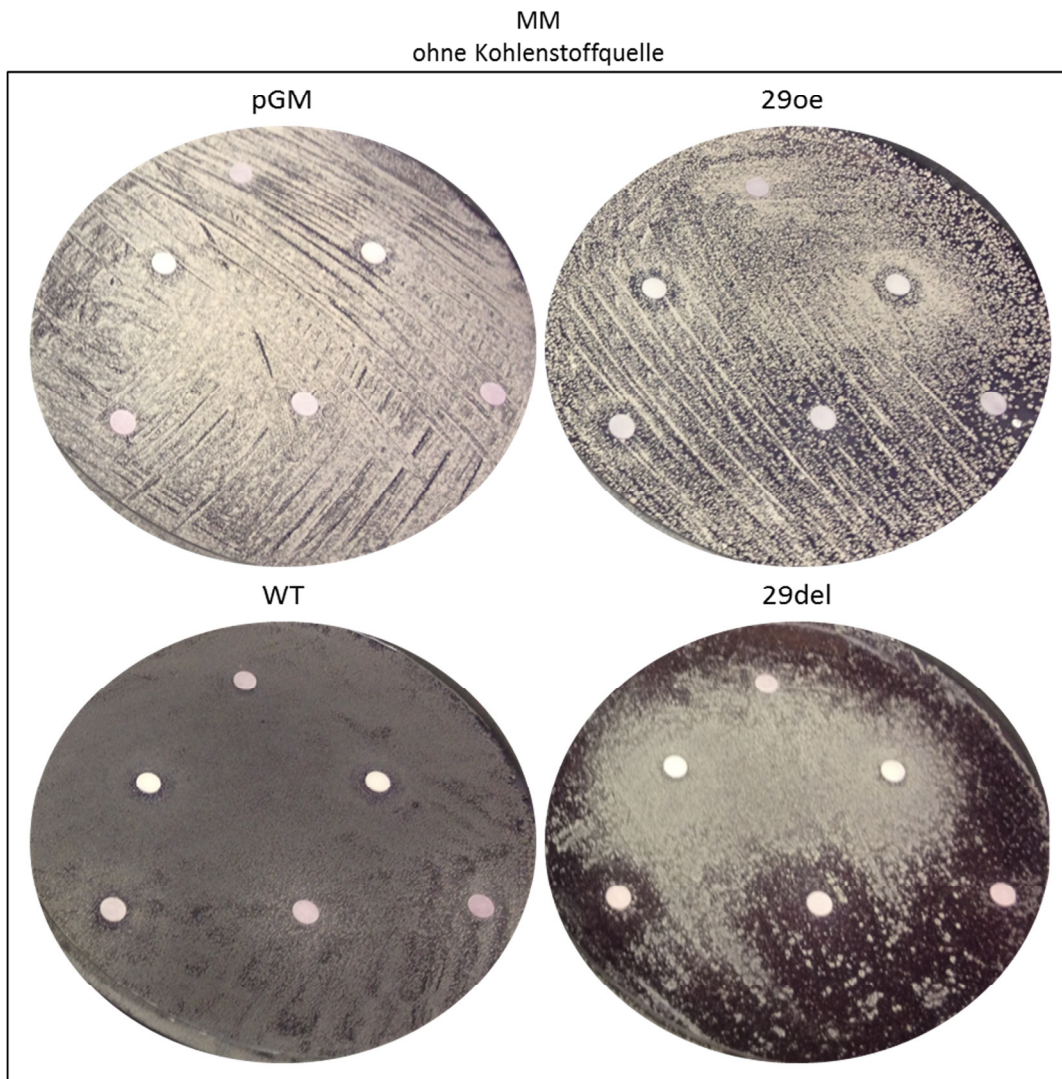


Abbildung 3.44: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) auf Acetyl-CoA, Pyruvat und Citrat

Die Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) sowie die Referenzstämme des Wildtyps (WT) und des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) wurden auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) ausgestrichen. Auf dem Medium aufgelegte Filterplättchen wurden mit Acetyl-CoA, Pyruvat und Citrat verschiedener pH-Werte betropft. Die verwendeten Lösungen sind Tabelle 3.11, die Verteilung der entsprechenden Filter Abbildung 3.43 zu entnehmen.

Da im letzten Versuchsansatz Pyruvat nur mit pH 1 zur Verfügung stand, wurde die Anzucht noch einmal mit Pyruvat mit einem pH von 1 und 6 wiederholt.

Wie im vorherigen Versuch zeigte der Stamm pGM einen schmalen Bereich direkt um das Filterplättchen, in dem die Zellen schlechter wuchsen. Bei der Überexpression von scr2952 (29oe) war wieder der Ring mit verstärktem Wachstum um den Filter zu sehen, dieser war aber aufgrund des hohen Hintergrundwachstums nicht gut zu erkennen. Der Wildtyp (WT) reagierte nicht auf das supplementierte Pyruvat, weder mit pH 1 noch pH 6. Bei der Deletion von scr2952 (29del) zeigte sich ganz eindeutig ein gesteigertes, ringförmiges Wachstum der Zellen um den Filter mit Pyruvat, pH 1, nicht aber bei Pyruvat mit pH 6 (Abbildung 3.45).

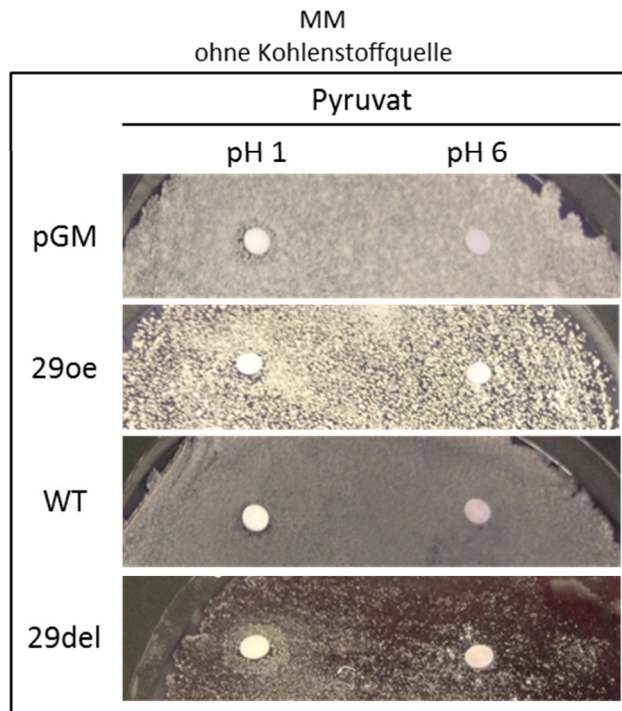


Abbildung 3.45: Überprüfen des Wachstumsverhaltens der Referenzstämmen sowie der Überexpression und Deletion von scr2952 bei Supplementierung mit Pyruvat verschiedener pH-Werte

Auf Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle (MM) wurden der Wildtyp (WT) und der Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie die Überexpression und Deletion von scr2952 (29oe bzw. 29del) ausgestrichen. Filterplättchen wurden auf das Medium aufgelegt und mit 5 µl einer 10%igen Pyruvat-Lösung verschiedener pH-Werte (pH 1 bzw. 6) betropft.

3.6.4.3 Zusammenfassung Citrat und scr2952

Citrat übte in Kombination mit einem veränderten Expressionslevel der sRNA scr2952 einen Effekt auf das Wachstumsverhalten von *S. coelicolor* aus. Eine Vielzahl an verschiedenen Expressionstests auf Festmedien konnte diese Wirkung jedoch nicht genauer bestimmen. Der pH-Wert spielte eine Rolle, da Citrat nur in Kombination mit einem pH-Wert von 1 einen Effekt hervorrufen konnte. Andere Nährstoffe, wie z.B. Malat, konnten auch in niedrigem pH-Bereich keine Änderung induzieren. Oxalacetat, Pyruvat und Citrat veränderten, wenn sie mit niedrigem pH auf das Medium appliziert wurden, das Wachstumsverhalten des Überexpressions- und Deletionsstammes der sRNA scr2952. Aufgrund der Nähe dieser Substanzen im Stoffwechsel ist zu vermuten, dass scr2952 eine Rolle innerhalb der Regulation des Citratzyklus spielen könnte.

3.7 Deletionsstämme der sRNAs scr4632 und scr6925

3.7.1 Phänotypische Besonderheiten der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

Nach der Konjugation der Deletionsplasmide zeigten die Kolonien der beiden Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 eine Blaufärbung durch die Substratumsetzung der β -Glucuronidase (Abb. 3.46). Sie konnten zudem auf Apramycin-haltigem Medium wachsen. Das Rückgrat des Plasmids hatte demnach in einem *single crossover* in das Genom integriert. Es konnte jedoch für die Deletionsansätze beider sRNAs innerhalb von zwei Jahren kein *double crossover* erzielt werden.

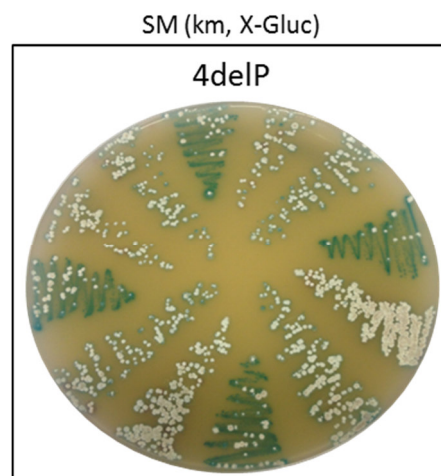


Abbildung 3.46: Vereinzelung des Deletionsstammes von scr4632 (4delP)

Nach der Konjugation des pCK-Plasmids wurden die Zellen auf Soja-Mannitol-Medium (SM) mit Kanamycin und X-Gluc vereinzelt. Die blaue Färbung zeigte die Umsetzung des Substrats durch das Protein der β -Glucuronidase und bestätigte die Integration des Plasmids.

Die entstandenen *single crossover*-Stämme werden im Folgenden als 4delP und 6delP bezeichnet, da die Stämme das Deletionsplasmid für die jeweilige sRNA (pCK_4del bzw. pCK_6del) noch enthielten. Trotz der Tatsache, dass das Rückgrat des Plasmids noch nicht aus dem Genom heraus rekombiniert war, konnte ein starker Phänotyp beobachtet werden.

Die Zellen von 4delP und 6delP wuchsen schneller und dichter als die des WT. Zudem setzte die Produktion von Actinorhodin deutlich früher ein. Abbildung 3.47 zeigt die soeben aufgezählten drei Stämme, welche zeitgleich auf Soja-Mannitol-Medium (SM) ausgestrichen worden waren. Die Platten wurden nach 72 h dokumentiert. Der WT ist gerade am Übergang von Luftmyzel zur Abschnürung von Sporen, während die Stämme 4delP und 6delP bereits sporulieren und Actinorhodin produzieren, zu erkennen an der dunklen Färbung des Mediums und der dunkelgrauen Oberfläche des Myzels.

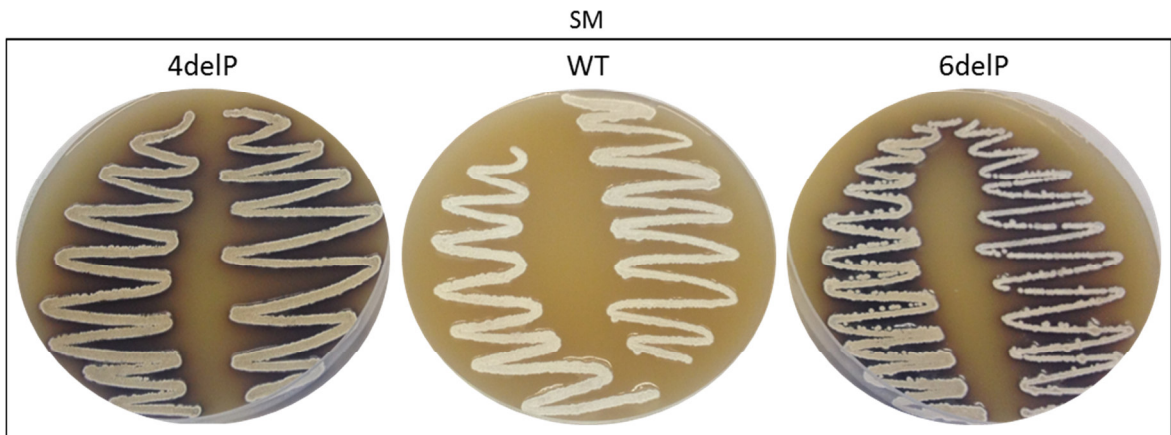


Abbildung 3.47: Wuchsverhalten der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 sowie des Wildtyps auf Soja-Mannitol-Medium

Die Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP und 6delP) wurden auf Soja-Mannitol-Festmedium (SM) ausgestrichen und ihr Wuchsverhalten mit dem des Wildtyps (WT) verglichen. 4delP und 6delP wuchsen schneller (Graufärbung der Oberfläche durch Sporenbildung) und produzierten früher Actinorhodin als der WT (dunkle Einfärbung des Mediums).

Die Stämme 4delP und 6delP begannen nicht nur früher als der WT Sporen abzuschnüren, sie produzierten in gleicher Zeit auch eine sehr viel größere Sporenmenge. Die Oberfläche des WT ist in der Regel gefurcht, da das Luftmyzel sich aus dem Substrat erhebt und eine Struktur aus erhöhten und talähnlichen Bereichen erschafft (Abb. 3.48 links). Bei 4delP und 6delP waren diese Absenkungen komplett mit Sporen ausgefüllt, die Oberflächenstruktur war fast eben, Furchen waren keine mehr zu erkennen. Auch die Schicht der gebildeten Sporen war sehr viel dicker als im WT. Beim Abtasten der Oberfläche mit einer Impfföse war der Unterschied deutlich spürbar. Die Oberfläche von 4delP ist mit dickem, weichen Samtstoff vergleichbar, die des WT mit rauer, fester Pappe (Abb. 3.48 rechts).

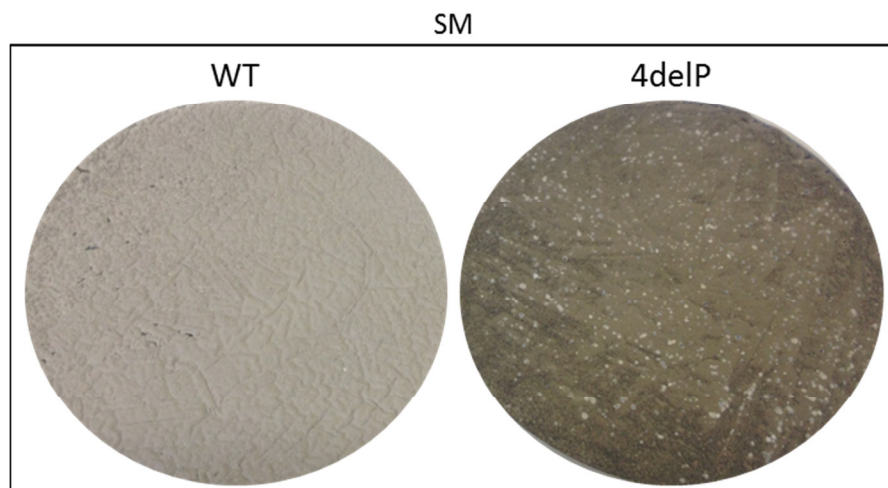


Abbildung 3.48: Sporenproduktion des Deletionsstammes von scr4632 (4delP) im Vergleich zum Wildtyp (WT)

Die beiden Stämme wurden auf Soja-Mannitol-Medium (SM) ausgestrichen und nach 144 h dokumentiert. Die Sporenproduktion von 4delP setzte früher ein und war sehr viel dichter und dicker als im WT. Das gleiche phänotypische Verhalten wurde auch beim Deletionsstamm von scr6925 (6delP) festgestellt.

Eine weitere, ungewöhnliche Besonderheit, die beide Stämme phänotypisch zeigten, war die tropfenförmig benetzte Oberfläche der Kulturen. Große, goldschimmernde, wässrige Tropfen bedeckten die komplette Oberfläche des Myzels. Ausschnitte einer SM-Platte, die die Goldfärbung und Tropfenbildung von 4delP zeigen, sind in Abbildung 3.49 dargestellt. Ein solcher Phänotyp wurde bisher in keiner anderen hergestellten Mutante von *S. coelicolor* beobachtet, noch in der Literatur beschrieben. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben der Universität Tübingen, die sich mit mikrobiellen Sekundärmetaboliten und der Produktion von Antibiotika beschäftigt, hatte auf Nachfrage noch von keinem vergleichbaren Phänotyp gehört. Auch Prof. Dr. Hildgund Schrempf von der Universität Osnabrück, die sich mit Actinobakterien und deren extrazellulären Vesikeln beschäftigt, war ein solcher Phänotyp unbekannt.

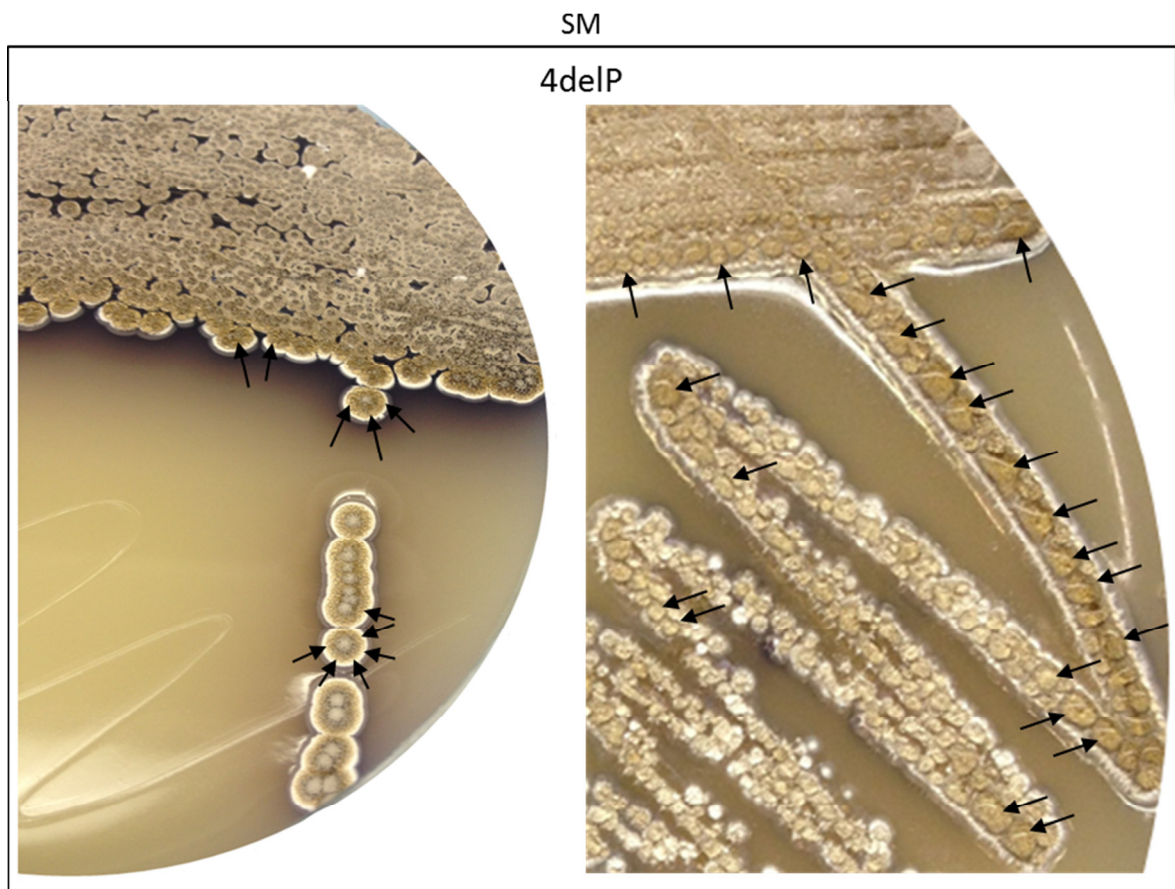


Abbildung 3.49: Ausschnitt von Soja-Mannitol-Platten (SM) bewachsen mit dem Deletionsstamm von scr4632

Zellen des Deletionsstammes von scr4632 (4delP) wurden auf Soja-Mannitol-Medium (SM) ausgestrichen. Nach 72 h bei 28°C wurde die Entwicklung dokumentiert. Auf den Zellen war eine Schicht goldener Substanz in wässrigen Tröpfchen zu sehen. Die schwarzen Pfeile markieren exemplarisch einige der auffälligsten sekretierten Tropfen. Die Oberfläche des Zellgeflechts war komplett benetzt. Auch 6delP zeigte die gleiche ungewöhnliche Sekretion der goldfarbenen Flüssigkeit.

Umso bemerkenswerter ist der Fakt, dass die soeben beschriebenen phänotypischen Merkmale nicht nur bei 4delP, sondern auch bei 6delP auftraten. Diese zwei verschiedenen Stämme wurden beide über die Konjugation mit dem Deletionsplasmid auf Basis des pCK-Plasmids hergestellt. Bei den Deletionen, die über einen Zwischenschritt mit dem Plasmid pJetkmR hergestellt worden waren, ergaben sich keine besonderen Phänotypen.

3.7.1.1 Vergleich des Wachstums von Wildtyp und den Überexpressionen bzw. Deletionen von scr4632 und scr6925 auf zellulärer Ebene

Die phänotypischen Besonderheiten der neuen Stämme sollten richtig eingeordnet werden. Deshalb wurden die Charakteristika im Mikroskop (Olympus BH-2 mit Fototubus) und Binokular (Stereomikroskop BMS 143 Trino Zoom, Breukhoven) herausgearbeitet.

Der WT, die Überexpressionen von scr4632 und scr6925 (4oe bzw. 6oe) sowie die Stämme 4delP und 6delP wurden vorgekeimt, auf SM-Platten ausgestrichen und für 96 h bei 28°C inkubiert. Je angezogenem Stamm wurden in jeweils eine der Platten sterile Deckgläschen schräg in das Medium eingesteckt und an die Glas-Medium-Grenze 5 µl Sporensuspension getropft. Diese Deckgläschen konnten später je nach Dichte des Bewuchses direkt zur Mikroskopie verwendet werden, bzw. die an ihnen gebildeten Zellen einfach abgenommen und auf einen Objektträger übertragen werden.

In Abbildung 3.50 A ist das Ergebnis der Mikroskopie der Deckgläschen des WT dargestellt. Die fadenförmigen Zellen (Hyphen) des WT waren zwischen 20 und 50 µm lang und wurden durch das Einziehen von Septen zu einzelnen Sporen abgeteilt. Durch mechanische Einwirkung von außen zerfielen diese Sporenketten später in kleinere Einheiten. Die Abbildung zeigt hauptsächlich Sporenketten, die sich noch nicht getrennt hatten. Wie bereits beschrieben, wächst der WT aufgrund des sich aus dem Substrat erhebenden Luftmyzels in Furchen. Diese waren unter dem Binokular eindrucksvoll zu sehen, talähnliche Bereiche und Erhebungen waren gut zu unterscheiden (Abb. 3.50 B). Abbildungsteil C (Abb. 3.50) zeigt eine einzeln gewachsene Kolonie des WT. Am Rand rings um die Kolonie ist deutlich sichtbar, dass sie in das Medium abgesunken war. *S. coelicolor* kann den Agar im Medium verwerten und sinkt bei Verbrauch des Agars in unmittelbarer Nähe der Kolonien in das Medium ein (Abb. 3.50 Pfeil Nr. 1). (Buttner *et al.*, 1987) Gut zu erkennen waren auch die verschiedenen Wuchsphasen der Zellen. Der weiße Rand der Kolonie bestand aus Luftmyzel (Abb. 3.50 Pfeil Nr.2), die graue Spitze aus bereits fertig abgeschnürten Sporen (Abb. 3.50 Pfeil Nr. 3).

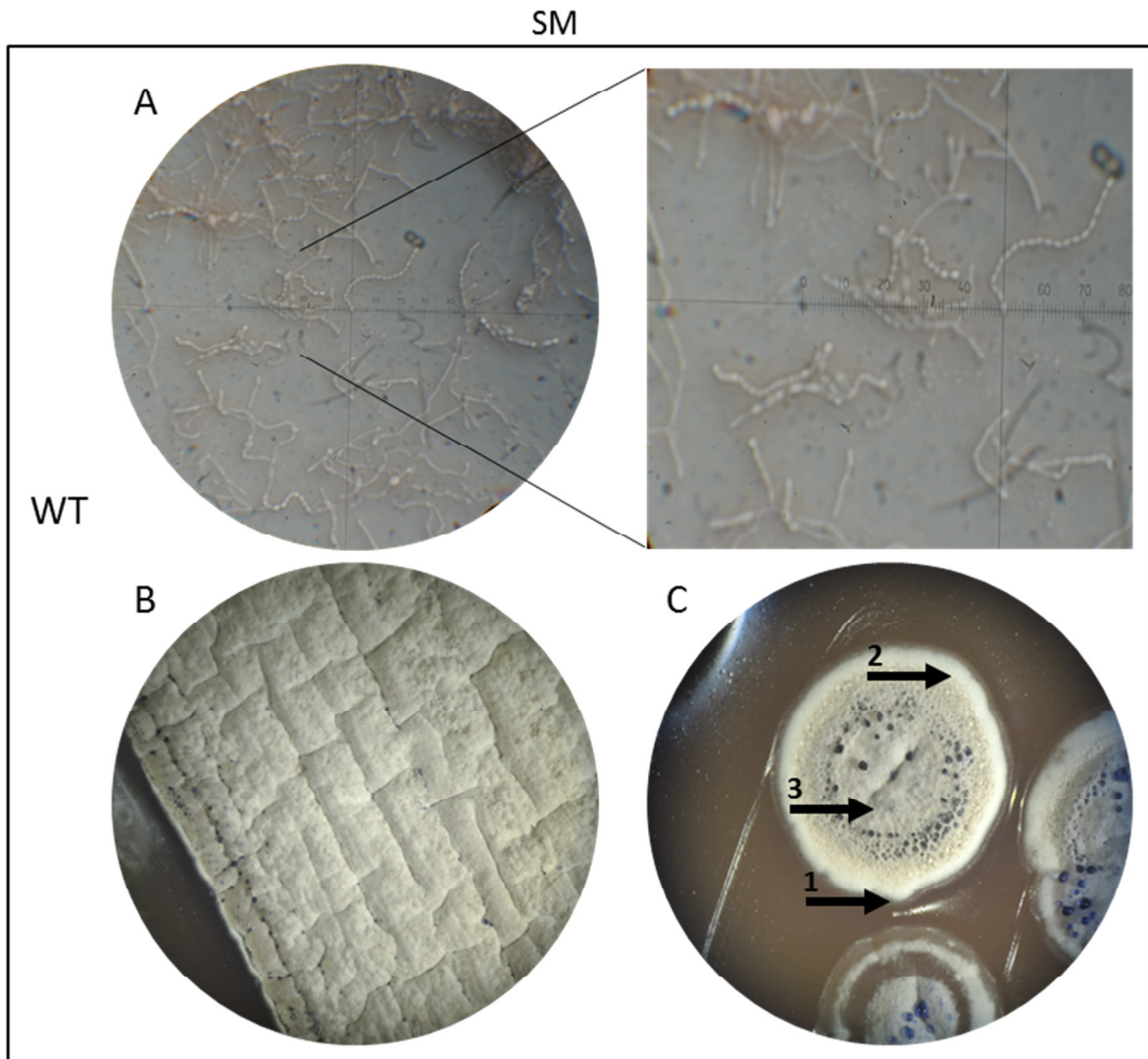


Abbildung 3.50: Wachstum des *S. coelicolor*-Wildtyps

A Auf in Soja-Mannitol-Medium (SM) eingesteckten sterilen Deckgläschen getropfter Wildtyp (WT) von *S. coelicolor* wuchs in fadenförmigen Myzelien, die sich im Verlauf des Wachstums in einzelne Sporen abschnürten und im Mikroskop (bei 100x Vergrößerung) gut zu erkennen waren. **B** Flächig auf SM ausgestrichen, zeigte der WT den typisch gefurchten Wuchs mit abgesenkten und erhöhten Bereichen. **C** Die Fähigkeit von *S. coelicolor*, Agar als Nährstoff zu nutzen (Pfeil Nr. 1) und die verschiedenen Wuchsphasen aus Luftmyzel (Pfeil Nr. 2) und abgeschnürten Sporen (Pfeil Nr. 3) konnten ebenfalls gut beobachtet werden. Die dokumentierten Platten waren 96 h bei 28°C lang inkubiert worden.

Die Überexpression von scr4632 (4oe) zeigte eine enorm gesteigerte Menge an Myzelien im Mikroskop bei 100x Vergrößerung. Die Zellen wurden hier für besseren Kontrast mit Baumwollblau angefärbt. Trotz der großen Anzahl an Hyphen waren noch keine Sporen zu ermitteln (Abb. 3.51 A). Der Befund per Mikroskop konnte durch das Binokular bestätigt werden. Die Oberfläche des Zellgeflechts war sehr fein und dicht mit ungewöhnlich langen Hyphen bewachsen. Gleichzeitig war das Zellwachstum verlangsamt, da weder eine normale Actinorhodin-Produktion noch eine Sporenabschnürung zu erkennen war (Abb. 3.51 B). Im Detail einzelner Kolonien erkannte man gut den feinen Bewuchs der Hyphen und eine sehr spärlich einsetzende Actinorhodin-Produktion (Abb. 3.51 C Pfeilmarkierungen).

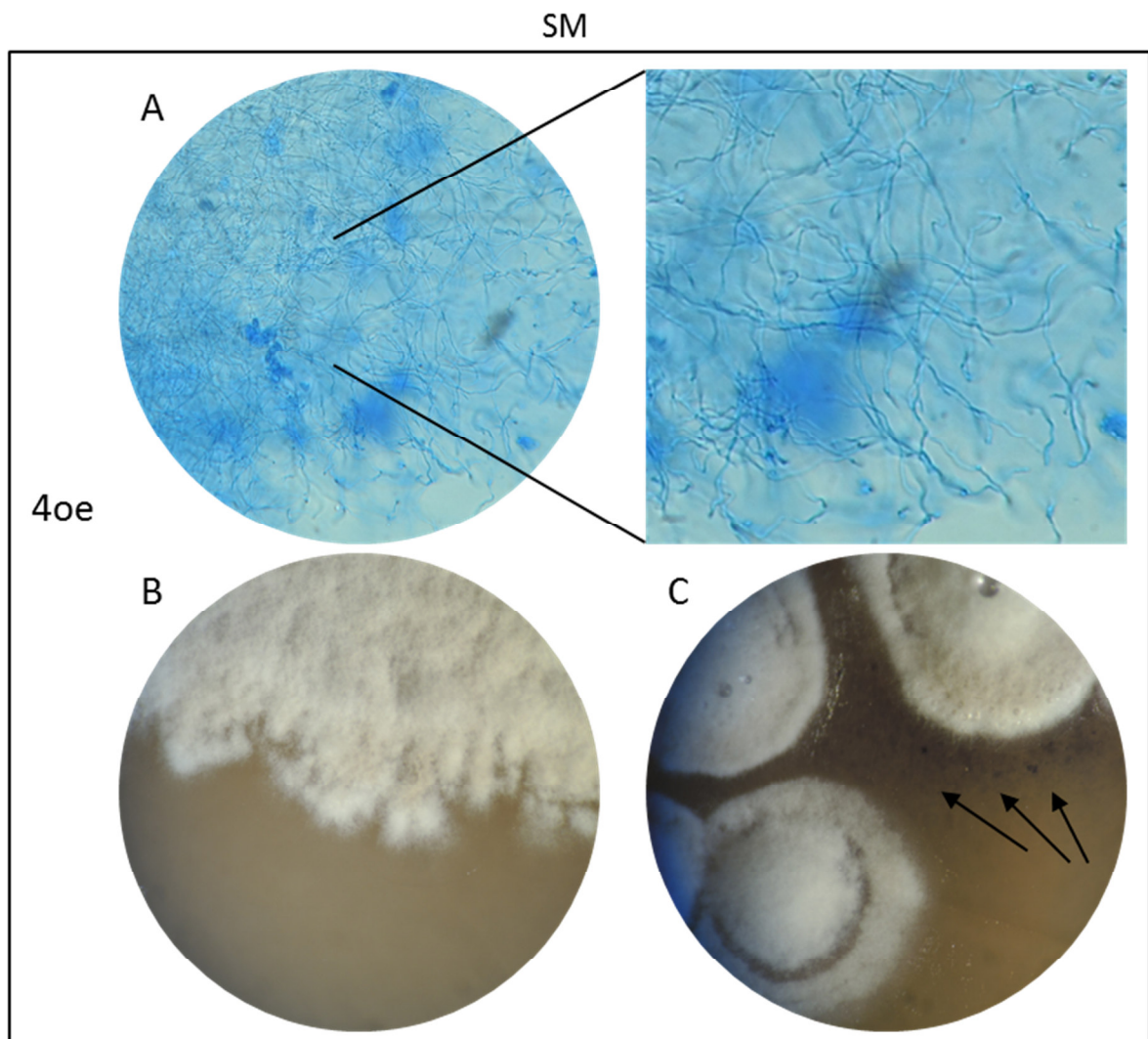


Abbildung 3.51: Wachstum des Überexpressionsstammes von scr4632 (4oe)

A Mikroskopische Darstellung (100x vergrößert) des Wachstums der Überexpression von scr4632 (4oe). Es waren ungewöhnlich lange Hyphen erkennbar. Die Zellen wurden für besseren Kontrast mit Baumwollblau angefärbt. **B** Wachstum von 4oe auf SM-Festmedium. Die langen Hyphen waren auch mit bloßem Auge als sehr feiner Wuchs zu erkennen. **C** Im Vergleich zum WT war das Wachstum etwas verzögert. Nach 96 h Inkubationszeit bei 28°C war nur weißes Luftmyzel, aber noch keine Sporenbildung zu verzeichnen. Die Produktion von Actinorhodin begann gerade erst (Pfeile).

Die ungewöhnlichen Eigenschaften des Stammes 4delP konnten in Mikroskop und Binokular gut identifiziert werden. Die stark erhöhte Produktion von Hyphen und Sporen, das beschleunigte Wachstum mit früherer Actinorhodin-Produktion sowie die sekretierte goldene Substanz auf dem Zellgeflecht sind in Abbildung 3.52 A-C dargestellt. Die Menge der goldfarbenen Flüssigkeit war so groß, dass sie mit einer Pipette direkt von der Zelloberfläche abgenommen werden konnte. Pro Festmedien-Platte (9 cm Durchmesser) konnten so bis zu 300 µl der Substanz gewonnen werden.

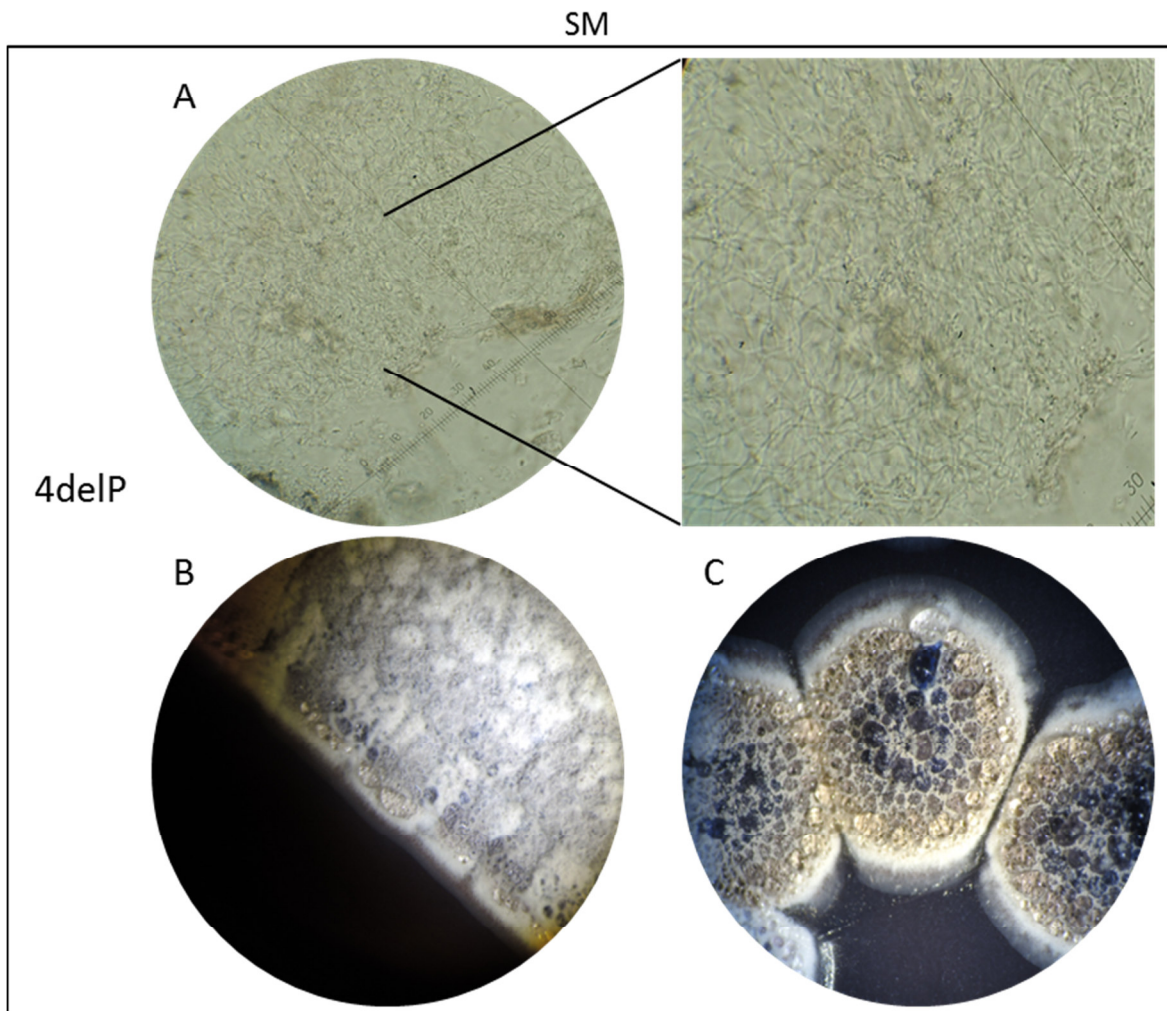


Abbildung 3.52: Wuchsverhalten von des Deletionsstamms von scr4632 (4delP) auf SM-Festmedium

A Im Mikroskop bei 100x Vergrößerung zeigte sich eine enorm große Menge an Myzel und Sporen im Wuchs der Deletion von scr4632 (4delP). Sporen waren in der Darstellung nur bedingt zu erkennen, da sie sich nicht gleichzeitig mit dem Myzel dokumentieren ließen. **B** 4delP wächst schneller als der WT (graue, sporenreiche Oberfläche) und produzierte mehr Actinorhodin (dunkle Färbung des Mediums). **C** Der Stamm 4delP produziert zudem eine große Menge einer goldfarbenen Substanz, die in großen wässrigen Tropfen an der Oberfläche sezerniert wird.

Die Überexpression der sRNA scr6925 (6oe) zeigte Wachstum in Form sehr langer und feiner Hyphen mit nur wenigen abgeschnürten Sporen. Für einen höheren Kontrast war das Präparat mit Baumwollblau anfärbt worden (Abb. 3.53 A). Bei flächig ausgestrichenem Wuchs auf SM bildete sich ebenfalls ein sehr langsam wachsendes, feingliedrig verzweigtes Zellgeflecht. Die Produktion von Actinorhodin hatte noch nicht eingesetzt (Abb. 3.53 B). Besonders beim vereinzeltten Wachstum von Kolonien der Überexpression von scr6925 (6oe) waren die langen und feinen Hyphen deutlich zu sehen (Abb. 3.53 C). Es fiel auf, dass sich die Wuchsformen der beiden untersuchten Überexpressionen (4oe und 6oe) sehr ähnelten.

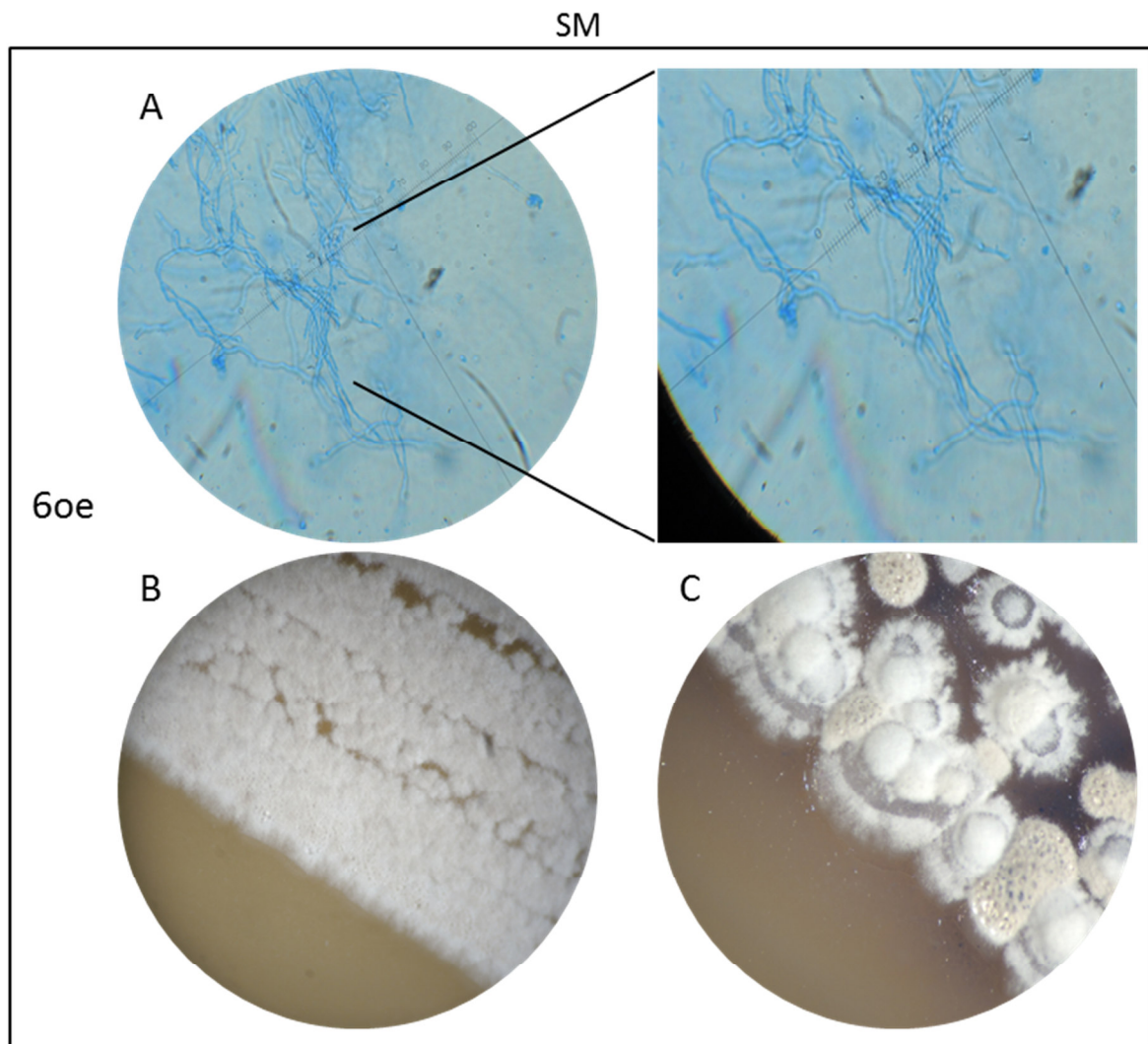


Abbildung 3.53: Phänotypische Untersuchung der Überexpression von scr6925 (6oe)

A Bei 100x vergrößerter Betrachtung im Mikroskop fielen bei 6oe vor allem die enorm langen, feinen Hyphen auf. Sporen oder Sporenketten waren kaum zu sehen. Das Präparat war mit Baumwollblau anfärbt worden. **B** 6oe wuchs langsamer als der WT und zeigte nach 96 h Inkubation bei 28°C noch keine Sporenbildung. Auf SM konnte nur weißes Luftmyzel ermittelt werden. **C** Bei Wachstum in einzelnen Kolonien fielen besonders die kreisförmig um die Kolonie wachsenden, langen Hyphen auf. Wie bei 4oe zeigt auch dieser Stamm noch keine Sporenbildung.

Die eingangs beschriebenen phänotypischen Besonderheiten von 6delP zu Sporen- und Actinorhodinmenge sowie der produzierten goldfarbenen Flüssigkeit konnten in Mikroskop und Binokular bestätigt werden (Abb. 3.54 A-C). Der Phänotyp von 4delP und 6delP gleichen sich im Detail.

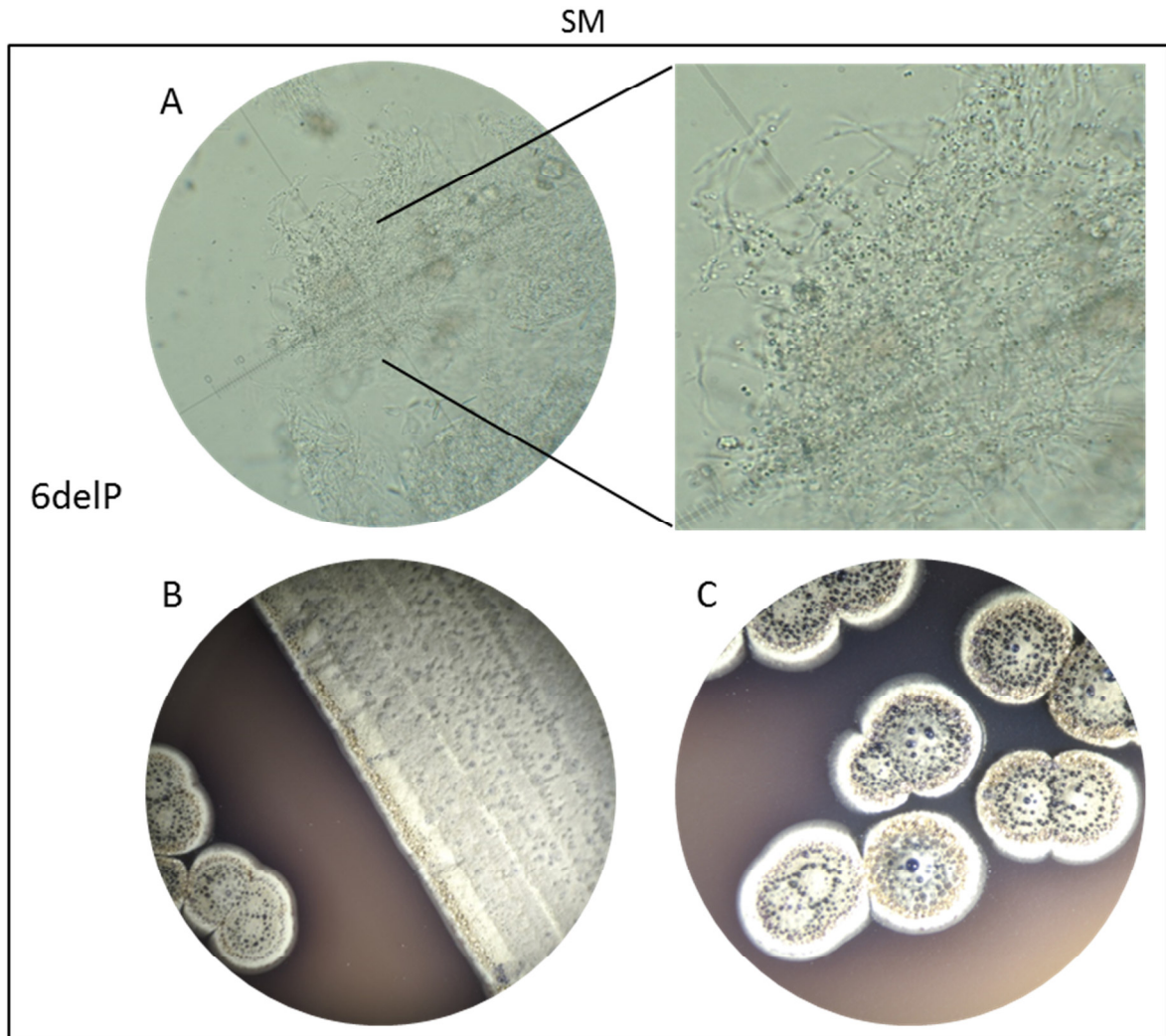


Abbildung 3.54: Dokumentation des Wachstums von *S. coelicolor/pCK_6del* (6delP)

A Ähnlich wie 4delP zeigte auch 6delP eine sehr hohe Myzelien-Dichte und sehr viele Sporen. Diese konnten hier gut dokumentiert werden (100x Vergrößerung). **B** 6delP wuchs schneller als der WT und produzierte rasch Actinorhodin (dunkle Färbung des Mediums) sowie ein dichtes Luftmyzel, aus dem es Sporen abschnürt (graue Oberfläche des Zellgeflechts). **C** Auch bei 6delP waren die Stadien des Luftmyzels (weißer Ring um die Kolonien) und der Sporen (graue Spitze) sowie das gebildete Actinorhodin (dunkle Medienfärbung) und die sekretierte goldfarbene Substanz gut zu unterscheiden.

3.7.1.2 4delP und 6delP auf verschiedenen Voll- und Minimalmedien

Da der ungewöhnliche Phänotyp von 4delP und 6delP bisher nur auf Soja-Mannitol-Vollmedium (SM) getestet wurde, sollten weitere Medien überprüft werden. Neben SM wurden die Vollmedien GYM und R2YE sowie ein Minimalmedium (MM) getestet.

Auf SM wuchsen der Referenzstamm der Überexpressionen (pGM) und die Überexpressionen von scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) langsamer als der WT, dessen Sporulation (graue Einfärbung der Myzeloberfläche) bereits früher einsetzte. Die Deletionsstämme 4delP und 6delP wuchsen

schneller, produzierten bereits früher Actinorhodin und sekretierten eine große Menge der goldschimmernden Flüssigkeit. Auf Medium mit aufgelegter Folie wuchsen alle Stämme etwas flacher und breiter, keiner davon sezernierte aber eine Flüssigkeit (Abb. 3.55). Die Folie wurde in einigen Versuchen verwendet, um die Zellen auf Festmedium anziehen, aber dennoch leicht vom Agar ernten zu können. Hierbei wurde ein Einfluss der Folie auf die Ausprägung des Wachstums sichtbar.

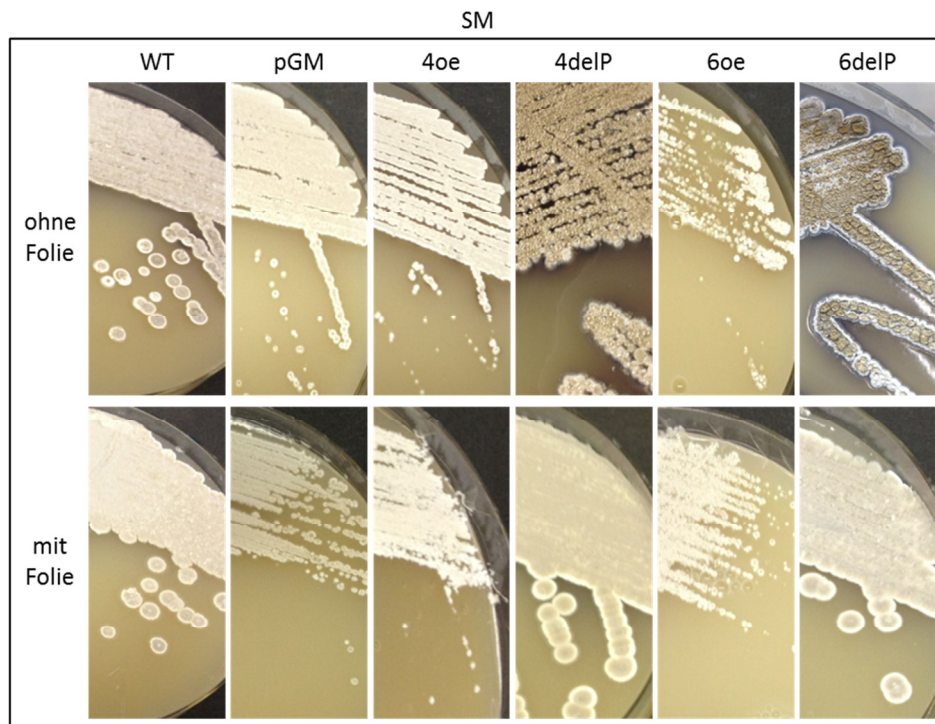


Abbildung 3.55: Wuchsvergleich der Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 sowie des Wildtyps auf Soja-Mannitol-Medium mit und ohne Folie

Der Wildtyp (WT), der Referenzstamm für die Überexpressionen pGM sowie die Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4oe, 6oe bzw. 4delP, 6delP) wurden auf Soja-Mannitol-Medium (SM) ohne und mit aufgelegter Folie angezogen. Die goldfarbene Substanz wurde nur von 4delP und 6delP auf Medium ohne Folie produziert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Dokumentation 72 h lang angewachsen.

An dieser Stelle soll eine Besonderheit hervorgehoben werden. Wie das gezeigte Bildmaterial illustrieren konnte, produzieren 4delP und 6delP keine goldene Flüssigkeit, wenn sie auf Folie angezogen werden. Sobald keine Folie vorhanden ist, wird die goldfarbene Substanz gebildet. Wie in Abbildung 3.56 dargestellt ist, begann die Produktion des goldenen Überstandes exakt am Ende des Randes der auf dem Medium aufgetragenen Folie (schwarze Pfeile).

Auf dem Vollmedium GYM ließen sich kaum Wachstumsunterschiede feststellen. Alle sechs Stämme sahen annähernd gleich aus, wobei sie auf Folie alle etwas langsamer wuchsen. 4delP und 6delP wuchsen auch ohne Folie ein wenig zeitverzögert (Abb. 3.57). Bei Wachstum auf R2YE zeigten sich ebenfalls kaum Unterschiede. 4delP war auf Folie ein wenig langsamer als die übrigen Stämme. Abgesehen davon sind alle Zellen sehr homogen (Abb. 3.58). Das getestete MM löste in jedem angezogenen Stamm, sowohl mit als auch ohne Folie, eine Wuchsverzögerung im Vergleich zu den Vollmedien aus (Abb. 3.59). Keiner der Stämme sekretierte eine Flüssigkeit.

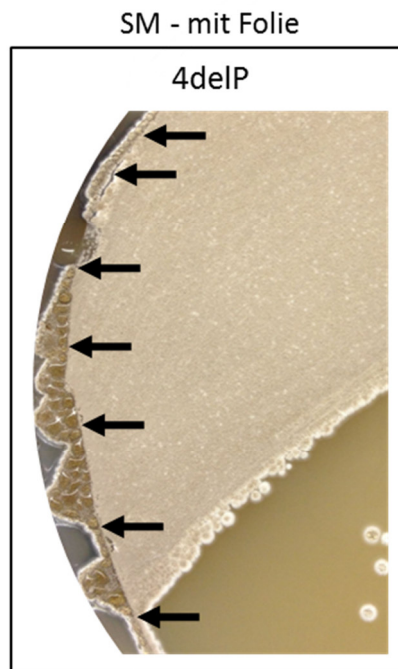


Abbildung 3.56: Anzucht des Wildtyps und der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 auf Soja-Mannitol-Medium mit aufgelegter Folie

A Detail einer Festmedien-Kultur von 4delP auf Soja-Mannitol-Medium (SM) mit Folie (angezogen für 72 h bei 28°C). Die schwarzen Pfeile markieren das Ende der auf dem Medium aufliegenden Folie. Mit Folie produziert der Stamm keine goldene Flüssigkeit, ohne Folie sehr viel. Die Abbildung ist exemplarisch mit 4delP dargestellt, 6delP verhielt sich exakt gleich.

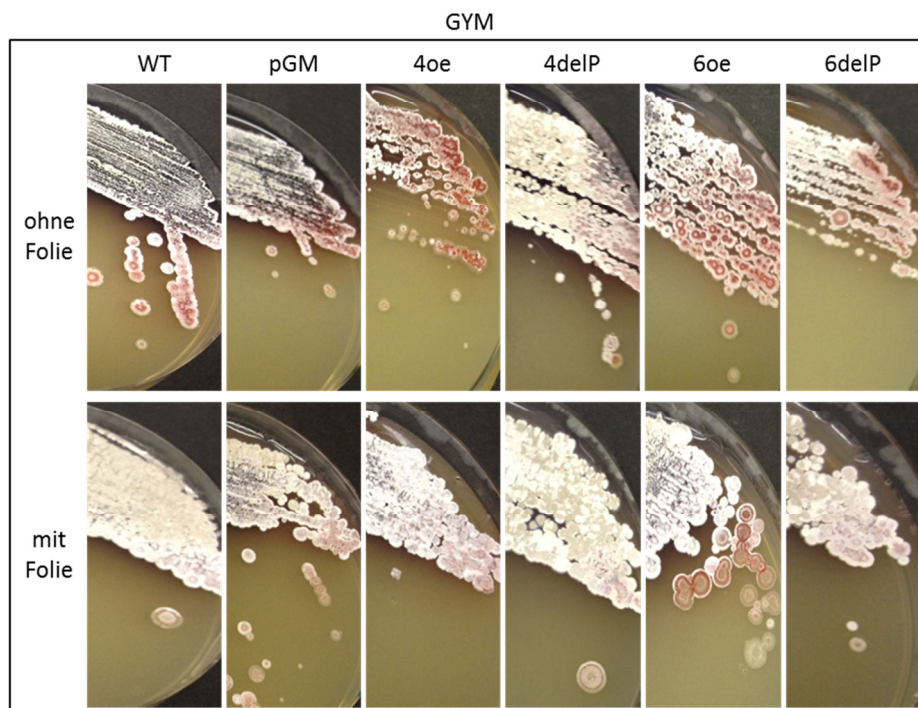


Abbildung 3.57: Auf GYM-Medium angezogener Wildtyp, Überexpressions- und Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 mit und ohne aufgelegte Folie

Die Überexpressionen und Deletionen von scr4632 und scr6925 (4oe und 6oe bzw. 4delP, 6delP) wurden zusammen mit dem Wildtyp (WT) und der Überexpressionsreferenz (pGM) auf GYM-Vollmedium angezogen. Die beiden Deletionen zeigten hier keine goldfarbene Flüssigkeit, ebenso kein anderer Stamm. Der Wuchs wurde nach 72 h bei 28°C fotografisch festgehalten.

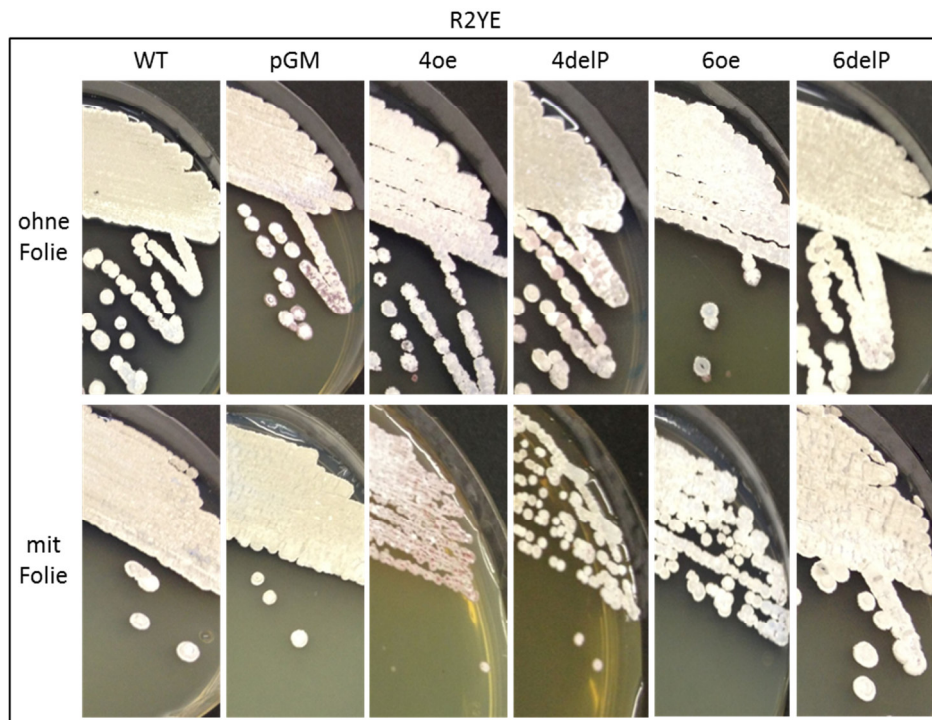


Abbildung 3.7.58: Wildtyp, Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 auf R2YE-Medium mit und ohne aufgelegte Folie

Wuchsvergleich des Wildtyps (WT), des Referenzstamms der Überexpressionen (pGM), der Überexpressionen und Deletionen der sRNAs scr4632 und scr6925 (4oe und 6oe bzw. 4delP und 6delP). Keiner der Stämme sekretierte eine Flüssigkeit. Die Dokumentation erfolgte nach 72 h bei 28°C.

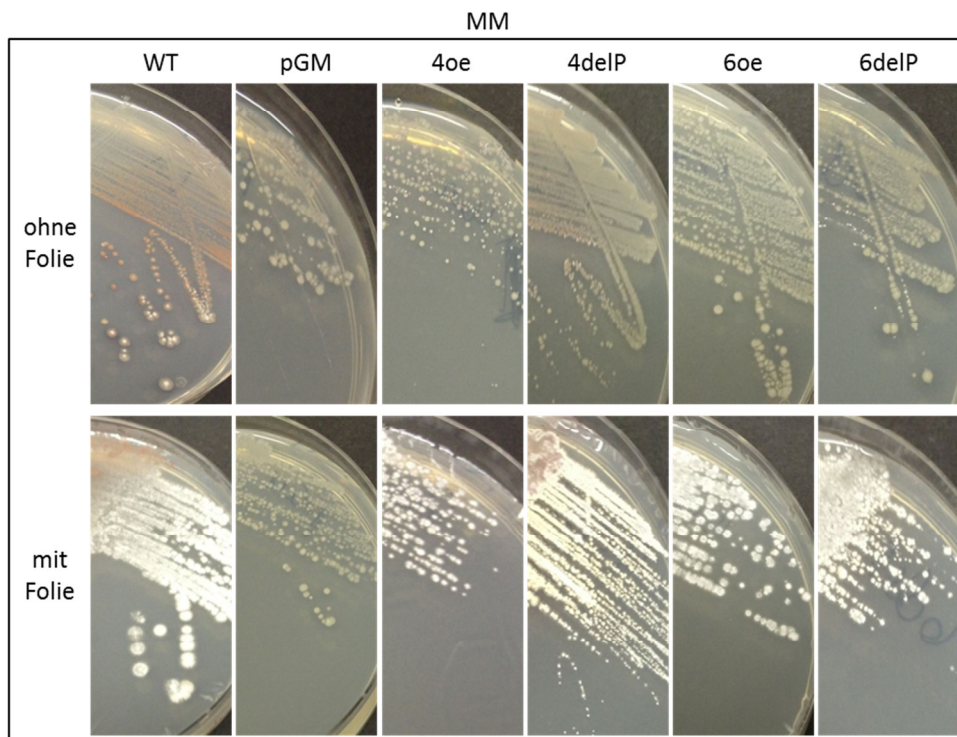


Abbildung 3.59: Wuchsvergleich der Überexpressions- und Deletionsstämme 4delP und 6delP sowie des Wildtyps auf Minimalmedium mit und ohne Folie

Der Wildtyp (WT), der Referenzstamm der Überexpressionen pGM sowie die Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4oe und 6oe bzw. 4delP und 6delP) wurden ohne und mit aufgelegter Folie auf Minimalmedium (MM) angezogen. Keiner der Stämme sezernierte eine Flüssigkeit. Die Zellen wurden für 72 h bei 28°C inkubiert.

3.7.1.2.1 Sekretion der goldfarbenen Substanz auf Soja- und Mannitolmedium

Nachdem gezeigt wurde, dass der Effekt des sekretierten goldfarbenen Überstandes nur bei den Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) auf Soja-Mannitol-Medium (SM) auftrat, wurden die Bestandteile des Mediums separat analysiert.

Die vorgekeimten Zellen von 4delP und 6delP wurden auf Soja-Medium (2% Soja, 2% Agar) und Mannitol-Medium (2% Mannitol, 2% Agar) angezogen. Zum Vergleich wurde jeweils eine Platte SM mitgeführt. Wie Abbildung 3.60 zeigt, sekretierten 4delP und 6delP auf SM und Soja-Medium (S) die goldschimmernde Flüssigkeit. Der Effekt war auf S sogar noch größer als auf SM. 4delP produzierte auf beiden Medien ein wenig mehr von der goldenen Substanz. Die Deletionsstämme wuchsen beide etwas schneller als der WT. Dies ist auch an der dunkleren Einfärbung des Mediums, ausgelöst durch beginnende Actinorhodinproduktion zu erkennen. Auf Mannitol-Medium (M) wurde das Wachstum aller drei Stämme gehemmt.

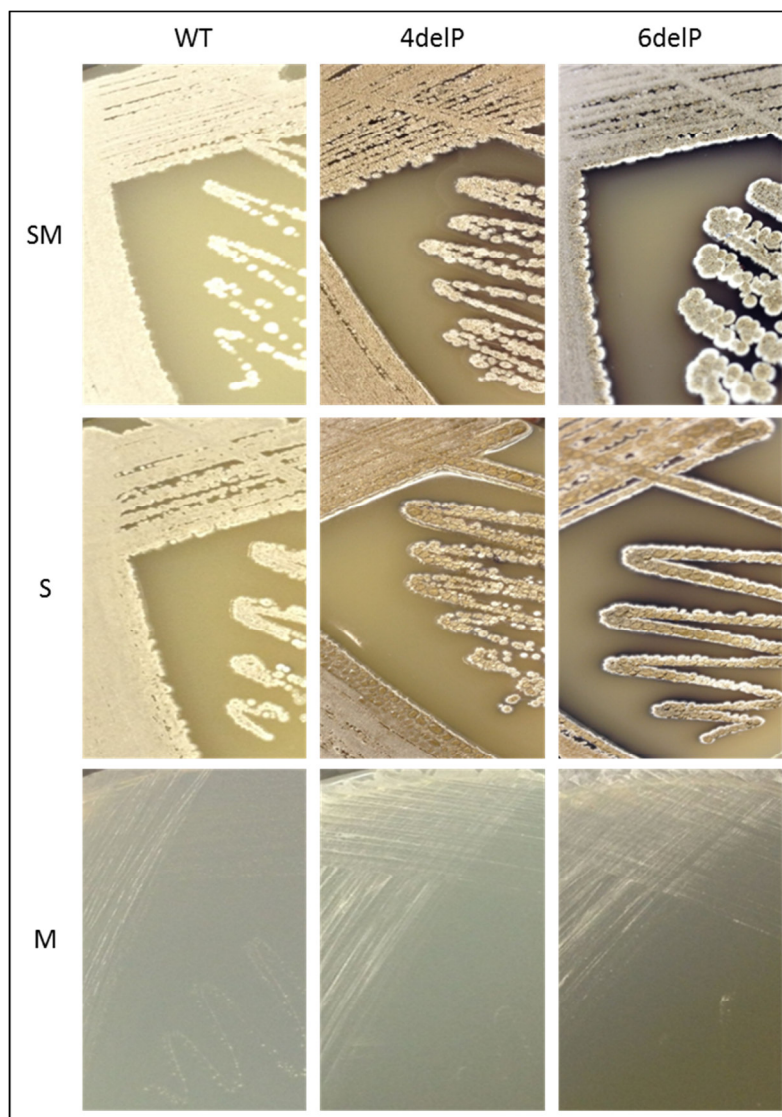


Abbildung 3.60: Wuchstest des Wildtyps und der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 auf Soja-Mannitol-, Soja- und Mannitol-Medium

Auf Soja-Mannitol-Medium (SM) produzierten die Deletionsstämmen 4delP und 6delP die goldfarbene Flüssigkeit, wobei 4delP die größere Menge sezernierte. Auf Soja-Medium (S) sekretierten beide Deletionsstämmen die goldene Flüssigkeit in höherer Menge als auf SM. Mannitol-Medium (M) verlangsamte den Wuchs aller drei Stämme. Die Platten wurden nach 72 h bei 28°C dokumentiert.

3.7.1.2.2 Sekretion der goldfarbenen Substanz auf verschiedenen Aminosäuren

Der soeben beschriebene Versuch zeigte, dass der Soja-Bestandteil des Soja-Mannitol-Mediums die Produktion der goldschimmernden Substanz in den Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) induzierte. Dieser Bestandteil ließ sich allerdings nur schwer in einzelnen Komponenten testen, da das für den Versuch verwendete Sojamehl aus der ganzen Sojabohne gewonnen wird. Inhaltsstoffe von Soja sind unter anderem Fette, Vitamine, Phytohormone und Aminosäuren (Anhang, Tab. 6.5). Da es sich bei Aminosäuren um definierte, analysierbare Substanzen handelt, wurden zunächst diese für die Überprüfung im Festmedium ausgewählt.

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin, Cystein, Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin, Arginin und Histidin wurden in 1%iger Endkonzentration dem Mannitol-Medium zugesetzt. Aufgrund ihrer Löslichkeitsgrenze mussten drei der Aminosäuren in veränderter Endkonzentration zugefügt werden: Tyrosin (0,04%), Asparagin (0,88%) und Leucin (0,96%). Als Kontrolle wurden Soja-Mannitol-Medium (SM) und Mannitol-Medium mit 1% addiertem Hefeextrakt (Endkonzentration) mitgeführt. Hefeextrakt wurde dem Mannitol-Medium zugesetzt, um zu überprüfen, ob ein komplexer Medienzusatz ähnlich dem Sojamehl die Produktion der goldenen Flüssigkeit anregen könnte.

Keine der Aminosäuren, die in Soja enthalten sind, konnten einen Phänotyp induzieren, bei dem eine goldfarbene Substanz gebildet wird. Die Supplementierung von Mannitol-Medium mit den Aminosäuren Arginin, Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure hemmte den Wuchs des Wildtyps sowie der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP). Bei hinzugefügtem Cystein war das Wachstum in allen drei Stämmen stark verlangsamt. Ein stark verlangsamtetes Wachstum wurde auch durch Lysin im Deletionsstamm von scr4632 (4delP) induziert, ebenso wie im Deletionsstamm von scr6925 (6delP) durch die Zugabe von Histidin (Tab. 3.12).

Die Zugabe der Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin zum Mannitol-Medium sowie der Zusatz von Hefeextrakt führte zu einem verstärkten Wachstum der drei getesteten Stämme (Tab. 3.12). Fotografien der bewachsenen Platten sind im Anhang (Abb. 6.14-6.19) zu finden.

Tabelle 3.12: Wuchsverhalten des Wildtyps und der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) auf Mannitol-Medium mit verschiedenen Aminosäure-Zusätzen

Medium	Zusatz	Wachstum			Sekret		
		WT	4delP	6delP	WT	4delP	6delP
Mannitol-Medium	Glycin	+	+	+	-	-	-
	Alanin	+	+	+	-	-	-
	Valin	+	+	+	-	-	-
	Leucin	+	+	+	-	-	-
	Isoleucin	+	+	+	-	-	-
	Methionin	+	+	+	-	-	-
	Prolin	+	+	+	-	-	-
	polare, Serin	+	+	+	-	-	-

SM-Medium	ungeladene Seitenketten	Threonin	+	+	+	-	-	-
		Cystein	(+)	(+)	(+)	-	-	-
		Asparagin	+	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	+	+	-	-	-
	aromatische Seitenketten	Phenylalanin	+	+	+	-	-	-
		Tyrosin	+	+	+	-	-	-
		Tryptophan	+	+	+	-	-	-
	positiv geladene Seitenketten	Arginin	-	-	-	-	-	-
		Histidin	+	+	(+)	-	-	-
		Lysin	-	(+)	-	-	-	-
	negativ geladene Seitenketten	Asparaginsäure	-	-	-	-	-	-
		Glutaminsäure	-	-	-	-	-	-
		Hefeextrakt	+	+	+	-	-	-
			+	+	+	-	+	+

Es wurde mehrfach gezeigt, dass der Phänotyp mit Sekretion von goldschimmernder Flüssigkeit nur bei 4delP und 6delP, nicht aber im WT von *S. coelicolor* oder in den Überexpressionen der beiden sRNAs auftrat. Der Phänotyp trat auf Soja-Mannitol-Medium wie auch in Medium, welches nur Soja enthielt auf. Einzelne Aminosäuren, die in Soja enthalten sind, konnten den goldenen Phänotyp nicht induzieren.

3.7.2 Identifikation der sekretierten goldfarbenen Substanz

3.7.2.1 Analyse der antibiotischen Wirkung auf Festmedium

Für die Analyse, ob es sich bei der durch die Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) sekretierten goldenen Substanz um ein Antibiotikum handeln könnte, wurde die antibiotische Wirkung auf verschiedenen Bakterienstämmen analysiert. Vier davon waren Gram-negativ (*Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* W207, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*), zwei weitere Gram-positiv (*Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis*).

Die Bakterien wurden auf LB-Platten flächig ausgestrichen und anschließend sterile Filterplättchen auf die Oberfläche gelegt. Es wurden je Filterplättchen 5 µl Antibiotika als Kontrolle sowie von 4delP und 6delP produzierte goldfarbene Flüssigkeit appliziert. Die getesteten Antibiotika, deren Konzentration sowie Verteilung auf dem Medium sind Tabelle 3.13 und Abbildung 3.61 zu entnehmen. Die beiden *E. coli*-Stämme, *S. marcescens* und *B. subtilis* wurden bei 37°C, *M. luteus* und *P. fluorescens* bei 28°C inkubiert.

Tabelle 3.13: Verwendete Antibiotika bzw. Lösungen zur Überprüfung der antibiotischen Wirkung auf unterschiedlichen Bakterienstämmen

Filter	Antibiotikum bzw. Lösung	Konzentration	Abkürzung
1	Ampicillin	100 mg/ ml	Amp
2	Phosphomycin	25 mg/ ml	Pho
3	Überstand 4delP und 6delP	unverdünnt	Überstand
4	Apramycin	50 mg/ ml	Apr
5	Kanamycin	50 mg/ ml	Kan

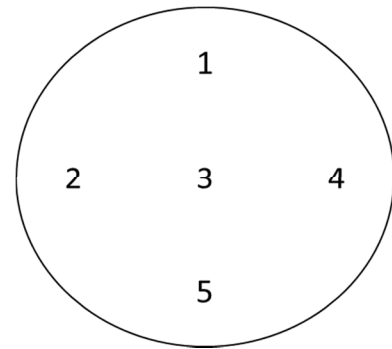


Abbildung 3.61: Filterplättchen-Verteilung auf LB-Medium

Zur Überprüfung der antibiotischen Wirkung des goldenen Überstandes von 4delP und 6delP wurden verschiedene Bakterienstämme auf LB-Medium ausgestrichen und sterile Filterplättchen aufgelegt. Welches (potentielle) Antibiotikum auf welchen Filter getropft wurde, kann Tabelle 3.13 entnommen werden.

Der auf seine antibiotische Wirkung zu überprüfende Überstand (mittleres Filterplättchen) zeigte bei keinem der getesteten Stämme eine Wuchshemmung (Abb. 3.62).

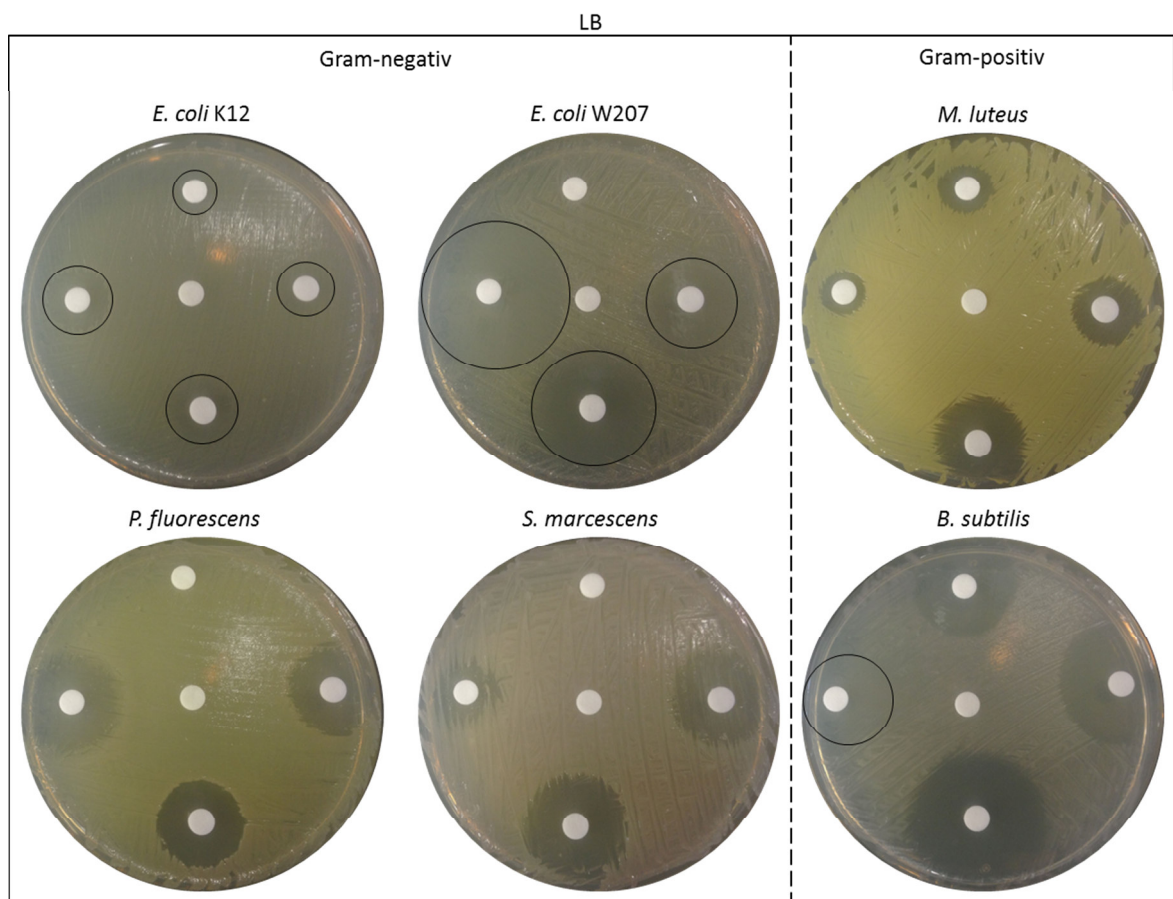


Abbildung 3.62: Überprüfung der antibiotischen Wirkung des von 4delP und 6delP produzierten Überstands (G-ÜS)

Auf LB-Medium wurden *E. coli* K12, *E. coli* W207, *P. fluorescens*, *S. marcescens*, *M. luteus* und *B. subtilis* ausgestrichen, Filterplättchen aufgelegt und diese mit Antibiotika-Lösungen bzw. dem goldfarbenen Überstand von 4delP und 6delP betropft. Die Lösungen und deren Verteilung auf den Platten ist Tabelle 3.13 und Abbildung 3.62 zu entnehmen. Hemmhöfe, die aufgrund des Kontrastes der Platte nicht gut zu erkennen waren, wurden mit einem Kreis umrandet.

3.7.2.2 Analyse der antibiotischen Wirkung in Flüssigkultur

Bei keiner Kultur der soeben aufgezählten Bakterienstämme kam es auf Festmedium zu einer Inhibierung des Wachstums durch die goldene Flüssigkeit. Bei einer weiteren Analyse in Flüssigkulturen zeigte sich der Zusatz des goldenen Überstandes anregend auf das Wachstum von *E. coli* K12, wenn es in sehr hoher Konzentration zugegeben wurde. Die übrigen getesteten Stämme zeigten keine Reaktion auf die Zugabe des Überstandes (Abb. 3.63). Eine antibiotische Wirkung der von 4delP und 6delP sezernierten goldschimmernden Flüssigkeit war somit ausgeschlossen.

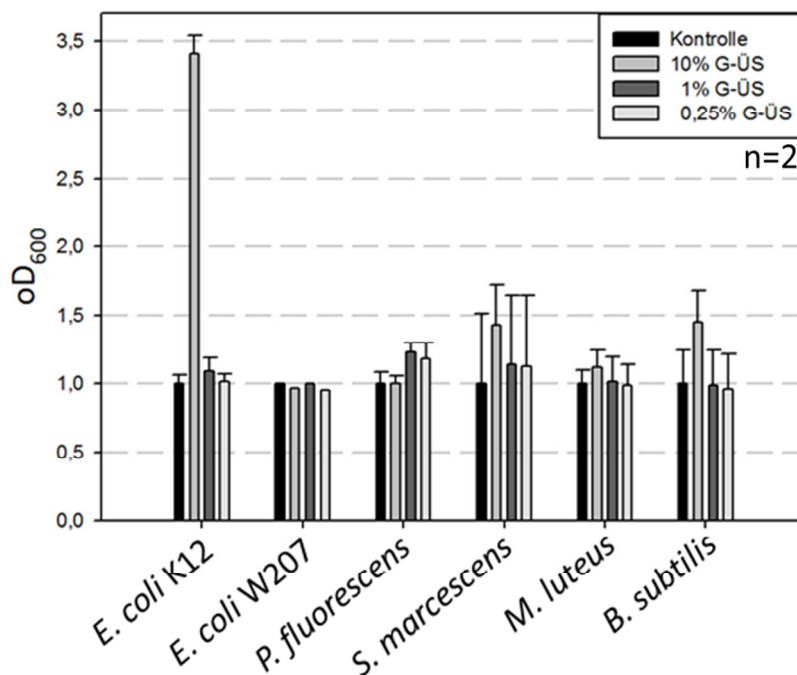


Abbildung 3.63: Überprüfung der antibiotischen Wirkung der sekretierten goldfarbenen Flüssigkeit von 4delP und 6delP in Flüssigkultur

Die gezeigten Bakterienstämme wurden in Flüssigkultur unter Zusatz des goldenen Überstandes (G-ÜS) angezogen und nach 16 h Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei 600 nm vermessen. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen des Wachstums der verschiedenen Stämme nach Zugabe der Substanz.

3.7.2.3 Protein-Analyse der sekretierten Flüssigkeit

Eine Analyse des Proteoms der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) wurde durchgeführt, um zu klären, ob in den Stämmen spezifisch Proteine hoch- oder herunterreguliert werden. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob mit der goldenen Flüssigkeit Proteine sekretiert werden.

Die Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) wurden zusammen mit den Überexpressionsstämmen der sRNAs (4oe und 6oe) sowie mit dem Wildtyp (WT) und dem Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) auf Soja-Mannitol-Festmedium (SM) angezogen. Die Kulturen wurden einmal auf Soja-Mannitol-Medium mit aufgelegter Folie und einmal ohne Folie angezogen.

In früheren Versuchen hatte sich gezeigt, dass 4delP und 6delP keine goldschimmernde Flüssigkeit sezernierten, wenn sie auf Festmedium mit aufgelegter Folie wuchsen (Abb. 3.56). Der WT begann auf Folie mit der Sezernierung einer klaren Flüssigkeit, die er ohne Folie in keiner Kultur

zeigte (Anhang, Abb. 6.20). Die Proteinexpression aller Stämme sollte daher auf beiden Anzuchtbedingungen überprüft werden.

Das Auflösungsvermögen bei der Auftrennung des Gesamtproteins eines Organismus im 1D-Gel unterliegt Grenzen und nicht alle Proteine können einzeln dargestellt werden. Im Gel auftretende Proteinbanden sind zumeist ein Gemisch aus mehreren Proteinen. Dennoch vermittelt die Auftrennung des Gesamtrohextrakts einen guten Überblick über die Verteilungsmuster von Proteinen in den verschiedenen Stämmen.

Der präparierte Proteinrohextrakt wurde für ein denaturierendes Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) verwendet (Abb. 3.64). In den linken Spuren der SDS-Page ist der Rohextrakt ohne Folie angezogener Zellen aufgetragen. Man konnte bei ca. 55 kDa eine unterschiedlich intensive Proteinbande erkennen (sternförmige Markierung). Diese Bande war in pGM, 4oe und 6oe schwächer, in WT, 4delP und 6delP stärker. Da jedoch die Intensität der Proteinbande im WT genauso hoch ist wie in den Mutanten 4delP und 6delP, muss davon ausgegangen werden, dass der hier verzeichnete Unterschied auf das in den Stämmen pGM, 4oe und 6oe enthaltene Plasmid zurückzuführen ist. Gleiches galt auch für die unterschiedlichen Proteinmengen bei 48 kDa (kreisförmige Markierung).

In den rechten sechs Spuren des Polyacrylamidgels wurde Rohextrakt aus Zellen aufgetragen, die auf SM mit Folie gewachsen waren. Auch hier wirkte das Proteinmuster homogen, wobei eine Proteinbande bei ca. 70 kDa deutlich hervortrat und eine weitere bei etwa 24 kDa auftrat. Die Hochregulation des Proteins für die genannten Banden war in diesem Fall nur bei 4delP und 6delP zu verzeichnen, nicht aber in den anderen Stämmen.

In Abbildung 3.64 B sind die beschriebenen Bereiche um 75 kDa und 25 kDa vergrößert dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass der Unterschied des Proteinmusters sich für beide Proteingrößen nur auf 4delP und 6delP bezieht. Die gezeigten Proteinbanden α - δ wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zur Analyse an das Proteome Center Tübingen übersandt.

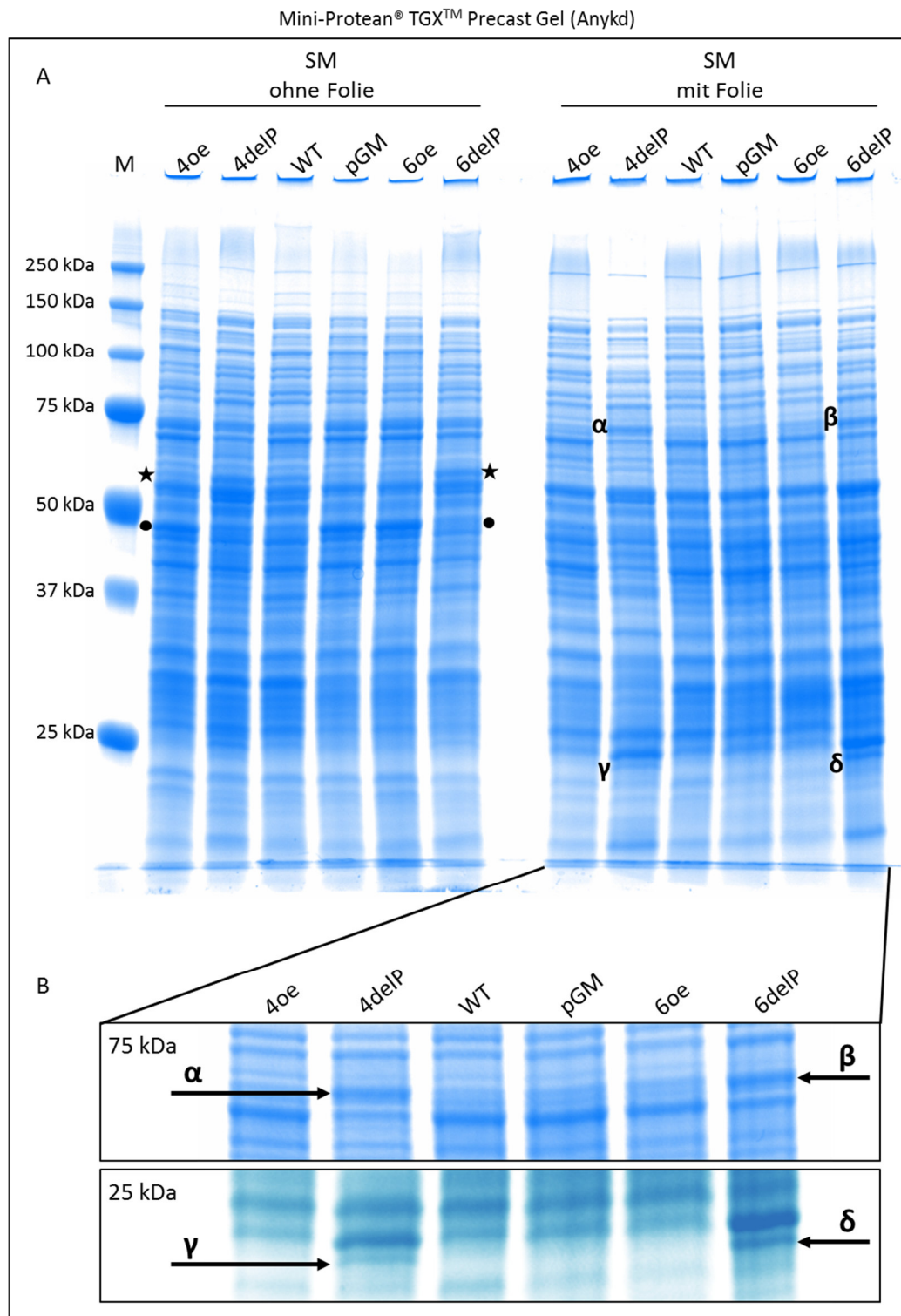


Abbildung 3.64: SDS-PAGE mit Proteinrohextrakt aus dem Wildtyp sowie den Überexpressionen und Deletionen von *scr4632* und *scr6925*

A Der Proteinrohextrakt wurde aus Zellen des Wildtyp (WT), des Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) und der Überexpressionen (4oe; 6oe) sowie Deletionen (4delP; 6delP) isoliert, die für 96 h auf Soja-Mannitol-Festmedium (SM) mit und ohne aufgelegte Folie angezogen worden waren. Die stern- und kreisförmigen Markierungen zeigen unspezifische Proteinänderungen. Als Marker wurde der Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard von Biorad verwendet (M). **B** Ausschnitte der SDS-PAGE der Kulturen, die auf Folie angezogen worden waren, bei 75 kDa und 25 kDa. In den Deletionsstämmen 4delP und 6delP sind in beiden Ausschnitten die hochregulierten Proteinbanden gut zu erkennen (schwarze Pfeile). Die Banden α bis δ wurden für die massenspektrometrische Untersuchung ausgeschnitten.

3.7.2.4 Analyse des sezernierten Überstandes der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

Der goldfarbene Überstand, der von den Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) sekretiert wurde, war von den Festmedien-Platten abgezogen und gesammelt worden. Als Kontrolle wurden zwei weitere von den Zellen gesammelte Flüssigkeiten verwendet. Zum einen die klare Substanz, die der Wildtyp (WT) auf Soja-Mannitol-Medium (SM) mit aufgelegter Folie zeigte (Anhang, Abb. 6.20), zum anderen ein dunkelblauer Überstand, der von sehr lange auf SM inkubierten WT-Zellen abgezogen worden war.

Aufgrund der unterschiedlichen Aufkonzentrierung der von den Zellen gesammelten Substanzen wurden verschiedene Proteinmengen auf das Gel aufgetragen. Von der vom WT produzierten klaren Flüssigkeit wurden 4 µg auf das Gel geladen (F), von der goldfarbenen Substanz aus 4delP 3 µg je Ernte (G1 und G2) und von der dunkelblauen Flüssigkeit (B) etwa 10 µg. Abbildung 3.65 A zeigt die angefertigte, mit Coomassie angefärbte, SDS-PAGE. In den Spuren von G1 und G2 ist insgesamt deutlich weniger Protein enthalten als in den Substanzen F und B des WT. Dennoch konnte eine deutliche Proteinbande in G1 und G2 identifiziert werden, die nicht in den Proben von F und B zu finden war (ε). Sie wurde ausgeschnitten und zur Analyse an das Proteome Center in Tübingen versendet.

Es wurde ein zweites Polyacrylamidgel angefertigt, bei welchem die Proteine mit Silberfärbung sichtbar gemacht wurden (Abb. 3.65 B). Von F wurden wieder 4 µg aufgetragen, von B diesmal jedoch nur 2 µg, um die Auftrennung der Banden zu verbessern. Von G1 wurden verschiedene Mengen (Nr. 1-5: 0,01 µg, 0,15 µg, 0,45 µg, 1,5 µg und 3 µg) auf das Gel geladen. Mit der Silberfärbung konnte eine weitere, nur in G vorkommende Proteinbande (ζ) identifiziert werden, die ebenfalls zur Analyse nach Tübingen geschickt wurde.

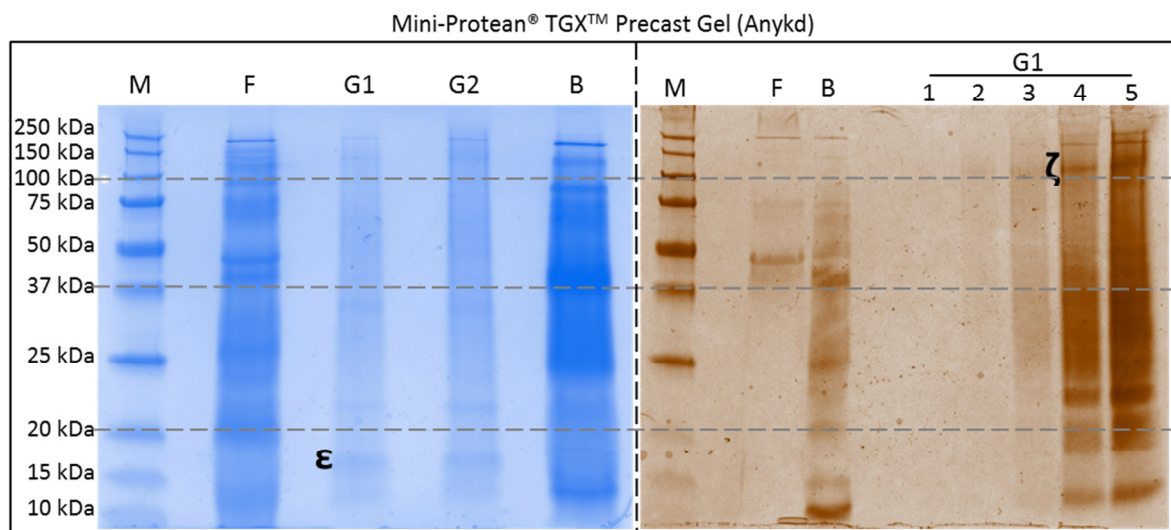


Abbildung 3.65: Proteinauftrennung der Überstände verschiedener Stämme – Coomassie- und Silberfärbung

Links Der goldfarbene Überstand (G) wurde aus zwei unterschiedlichen Ansätzen des Deletionsstamms von scr4632 (4delP) abgenommen. Der farblose (F) und dunkelblaue (B) Überstand stammt von WT-Kulturen auf Festmedium. F wurde von WT-Zellen auf Festmedium mit aufgelegter Folie abgenommen, B von WT-Zellen, die ohne Folie angezogen wurden. Als Marker (M) diente der Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard von Biorad. Die per Massenspektrometrie analysierten Banden sind mit ε bzw. ζ markiert. **A** Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. **Rechts** Die Proteine wurden bei dieser SDS-PAGE durch Silberfärbung angefärbt. Von der sekretierten goldenen Substanz wurden verschiedene Mengen (G1, 1-5) aufgetragen.

3.7.2.4.1 Massenspektrometrische Analyse der untersuchten Proteine

Die Rohfassung der Ergebnisse der Massenspektrometrie der an das Proteome Center in Tübingen übersandten Proteinproben ergab nach Ausschluss von ribosomalen Proteinen und Proteinfragmenten mit einer zu geringen Sequenzabdeckung sowie zu kleiner bzw. zu großer Proteine in vier der sechs analysierten Proben (α , β , δ , γ) das Protein BldKB. Dem Anhang können die bereits eingegrenzten Rohdaten den Abbildungen 6.21-6.26 entnommen werden.

Aus Tabelle 3.14 können die massenspektrometrischen Ergebnisse der fünf Proteinbanden abgelesen werden. Für α und β ergab die Analyse ein Molekulargewicht von 65 kDa, was mit den beobachteten Banden bei ungefähr 70 kDa im Gel korrespondiert. Die längste Peptidkette, die in der Analyse gefunden wurde und zur Sequenz von BldKB passt, waren 44 (α) bzw. 36 (β) Aminosäuren. Aus der Länge der Aminosäurekette ergibt sich eine Sequenzabdeckung von 77% (α) bzw. 62% (β). Bei den analysierten Proteinbanden von γ und δ waren die längsten übereinstimmenden Aminosäureketten mit 6 und 9 (γ und δ) kleiner, dementsprechend ergaben sich auch nur 11% bzw. 16% Sequenzabdeckung zu BldKB, jedoch wurde die Proteinbande aus dem Gelbereich bei nur etwa 24 kDa entnommen. Diese Größe passt zwar nicht zu den rund 65 kDa des Proteins BldKB selbst, doch die Banden γ und δ könnten aus einem natürlichen Abbauprodukt des Proteins stammen.

Tabelle 3.14: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Analyse der Proteinproben α - δ

Probe	Protein ID	Protein	Peptide	Molekulargewicht [kDa]	Sequenzabdeckung [%]
α	Q93IU2	BldKB, putative ABC transport system lipoprotein, SCO5113	44	65,532	77
β	Q93IU2	BldKB, putative ABC transport system lipoprotein, SCO5113	36	65,532	62
γ	Q93IU2	BldKB, putative ABC transport system lipoprotein, SCO5113	6	65,532	11
δ	Q93IU2	BldKB, putative ABC transport system lipoprotein, SCO5113	9	65,532	16

In der Analyse der Proteinbande ϵ lag die höchste Sequenzabdeckung bei 22% bei einem hypothetischen, uncharakterisierten Protein. Neben 21 Proteinen, die nur als hypothetisch annotiert waren, waren auch 5 Proteine mit annotierter Funktion (*sti1*, *sodN*, *ssb*, *coaD*, und *bfr*) unter den Ergebnissen der Massenspektrometrie (Anhang, Abb. 6.25).

Die Analyse der Proteinbande ζ ergab nach Vorselektion noch 11 mögliche Proteine. Davon waren 4 als hypothetische, sekretierte Proteine annotiert, 6 weitere Proteine waren als hypothetische, nicht-sekretierte Proteine annotiert (Anhang, Abb. 6.26). Nur zwei der Proteine waren nicht als hypothetisches Protein annotiert, sondern als Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpoB*) und Translationsinitiationsfaktor (*infB*).

Diese zwei Befunde lassen keinen Rückschluss auf die Art der von den Deletionsstämmen 4delP und 6delP sezernierten goldenen Flüssigkeit zu.

3.7.3 Genotyp der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

Die Zellen der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) wuchsen sowohl auf Kanamycin als auch immer noch auf Apramycin-haltigen Platten. Die Kanamycin-Resistenz sollte nach der homologen Rekombination die Sequenz der sRNA im Genom ersetzen, während Apramycin im Rückgrat des Plasmids kodiert war und nach der homologen Rekombination aus dem Genom herauskombinieren sollte.

3.7.3.1 Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in den Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP)

In einer Expressionsanalyse sollte festgestellt werden, ob sich die Integration der Plasmide und die damit verbundene Verdopplung der sRNA-Sequenz auf das Expressionslevel der sRNAs scr4632 und scr6925 auswirkte und so möglicherweise den goldenen Phänotyp induzieren konnte.

Der in Abbildung 3.66 dargestellte Northern Blot zeigte für die sRNA scr4632 auf den ersten Blick eine leichte Überexpression. Bezog man jedoch die vielen Prozessierungstranskripte mit in die Kalkulation ein, war die Überexpression insgesamt sehr viel stärker (Abb. 3.66 rechts). Die Analyse zeigte, dass die Deletion der sRNA nicht erfolgt war.

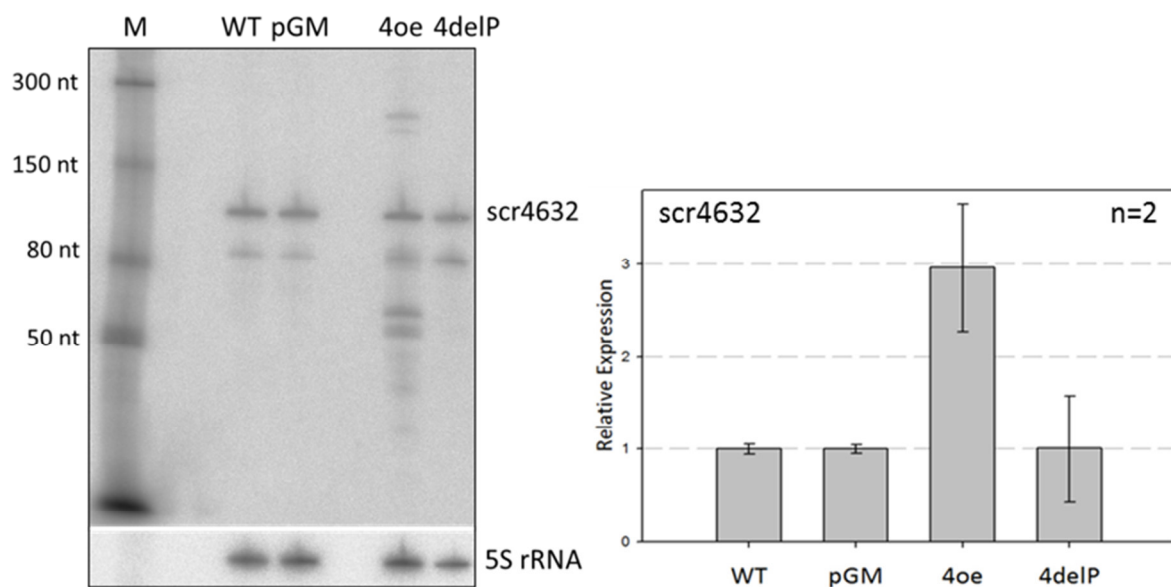


Abbildung 3.66: Expressionsanalyse der sRNA scr4632 im Überexpressions- und Deletionsstamm

Links Die Expression von scr4632 wurde im Wildtyp (WT), im Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie im Überexpressions- und Deletionsstamm (4oe bzw. 4delP) im Northern Blot untersucht. Als Marker diente die Low Range ssRNA Leiter (M). **Rechts** Quantifizierung der Expression aller Einzeltranskripte von scr4632.

Die Expression der sRNA scr6925 zeigte im Northern Blot eine starke Expression (Abb. 3.67 links). Das Expressionslevel ist 15x größer als die Expression der sRNA im Wildtyp (Abb. 3.67 rechts). Die Deletion von scr6925 hatte ebenfalls nicht funktioniert. Es zeigte sich somit, dass durch die Insertion der Plasmide das Expressionslevel der sRNAs erhöht war.

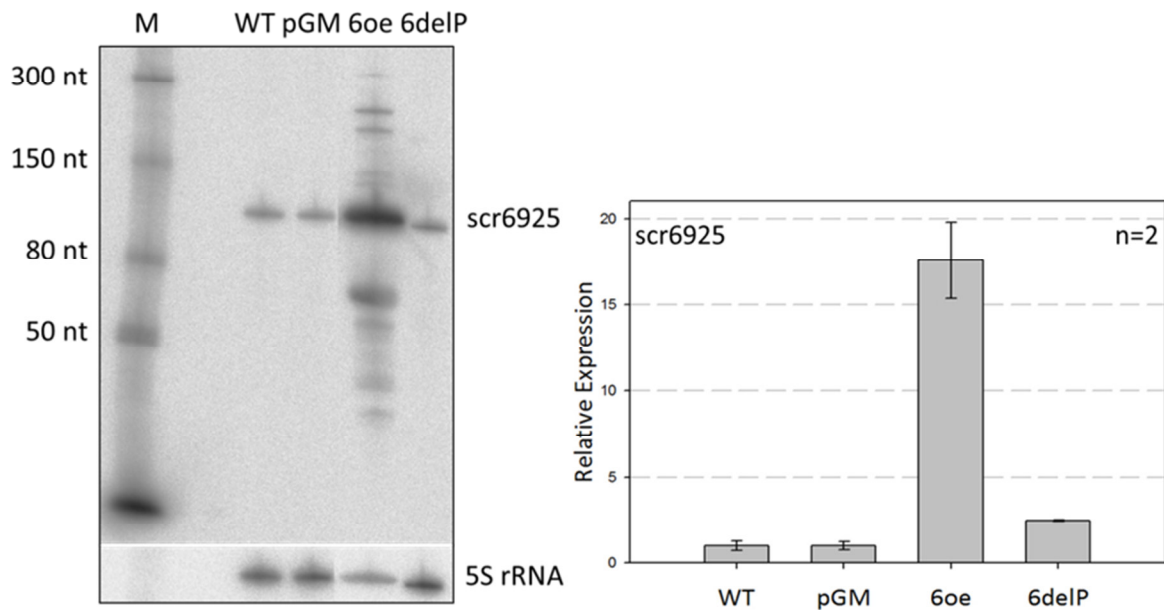


Abbildung 3.67: Expressionsanalyse der Überexpression und Deletion von scr6925

Links Die Expression von scr6925 wurde im Wildtyp (WT), im Wildtyp mit Leerplasmid pGMs (pGM) sowie in der Überexpression (6oe) und Deletion (6delP) in einer Northern Blot-Analyse untersucht. Die Low Range ssRNA Leiter wurde als Marker verwendet (M). **Rechts** Quantifizierung der sRNA Expression des gezeigten Northern Blots.

Bislang hatten die Deletionsstämme von zwei unterschiedlichen sRNAs (4delP bzw. 6delP) gleiche phänotypische Merkmale gezeigt, die sie vom WT unterschieden. Zudem produzierten beide Stämme große Mengen einer goldfarbenen Flüssigkeit. Dies war bisher noch nicht in Streptomyceten beschrieben worden. Eine weitere Beobachtung verknüpft beide sRNA ebenfalls miteinander. Bei der Expressionsanalyse der Überexpressionsstämme von scr4632 und scr6925 (4oe bzw. 6oe) wurde eine gegenseitige Beeinflussung beobachtet.

Die RNA des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) und der Überexpressionen von scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) wurden für eine Northern Blot-Analyse verwendet. Die beiden Teil-Abbildungen in 3.68 oben zeigen den gleichen Northern Blot, der einmal mit der radioaktiv markierten Sonde scr4632 (links) und einmal mit der Sonde für scr6925 (rechts) hybridisiert wurde. Hybridisierte man den Northern Blot mit der Sonde scr4632, ist die Überexpression der sRNA im Überexpressionsstamm von scr4632 (4oe) deutlich zu erkennen. Ebenso verhielt es sich für scr6925. Es fiel jedoch auf, dass die sRNAs im jeweils anderen Überexpressionsstamm ebenfalls höher exprimiert wurden als im WT. Dies bedeutete, dass die sRNA scr4632 auch im Überexpressionsstamm von scr6925 (6oe) erhöht vorlag und die sRNA scr6925 auch im Überexpressionsstamm von scr4632 (4oe) höher exprimiert wurde.

Die Quantifizierung der Northern Blot-Analyse ist in Abbildung 3.68 unten dargestellt. Die Überexpressionen der sRNA scr4632 bzw. scr6925 konnte in ihrem eigenen Überexpressionsstamm klar nachgewiesen werden (dunkelgrau). Die Expression der sRNAs war aber im Überexpressionsstamm der jeweils anderen sRNA ebenfalls erhöht (hellgrau). Der Referenzstamm pGM ist in schwarz dargestellt.

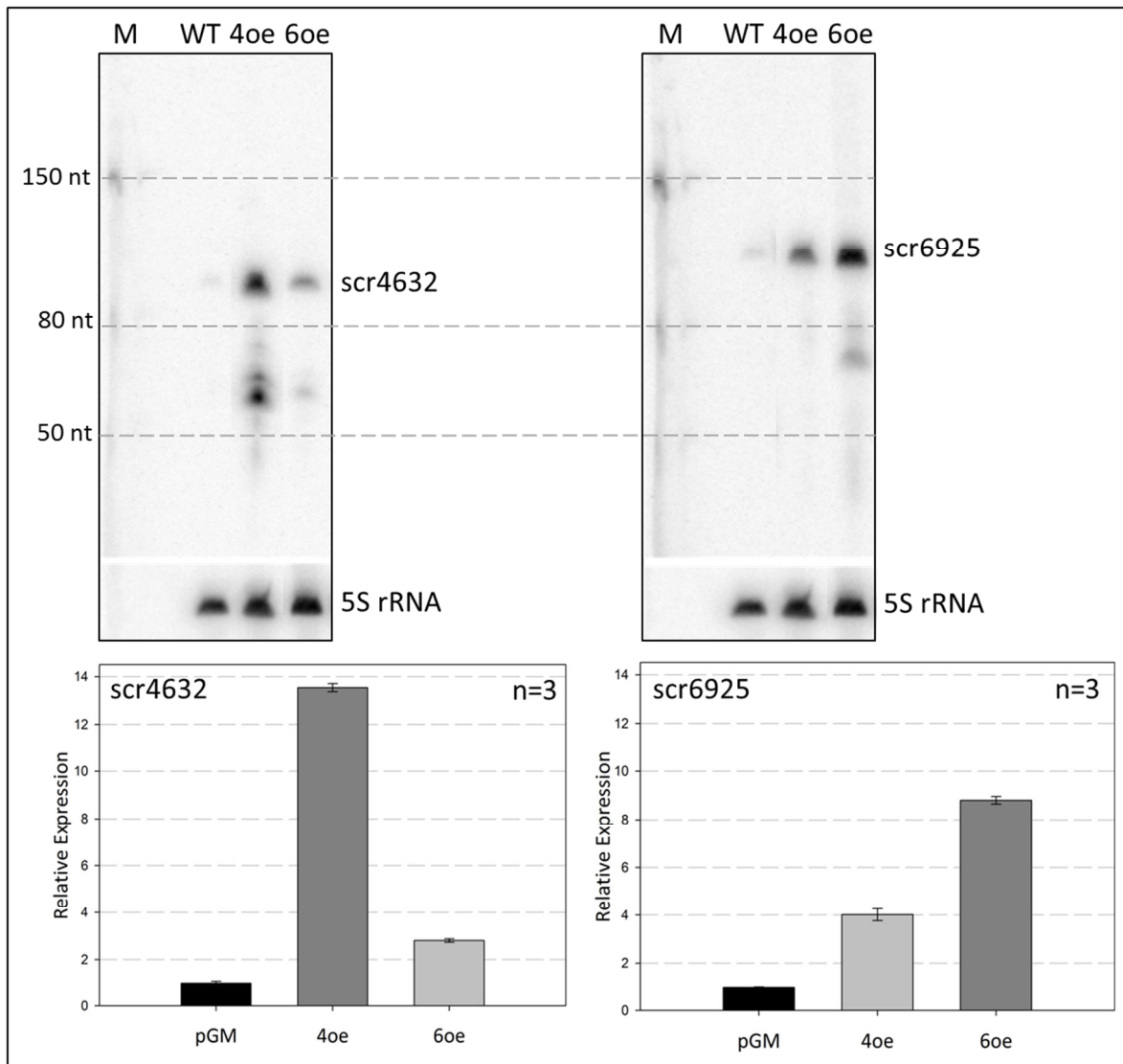


Abbildung 3.68: Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 bzw. scr6925 in den Überexpressionsstämmen von scr4632 und scr6925

Oben Die Expression des Wildtyps mit Leerplasmid pGMs (pGM) und der Überexpressionen von scr4632 (4oe) und scr6925 (6oe) wurden in einer Northern Blot-Analyse untersucht. Als Marker wurde die Low Range ssRNA Leiter (M) **Unten** Quantifizierung der oben gezeigten Northern Blots. Quantifiziert wurden alle detektierten Transkripte einer Spur. Der Überexpressionsstamm, dessen überexprimierte sRNA mit der Sonde gebunden wurde, ist in dunkelgrau dargestellt.

Die Beeinflussung der Transkriptmenge in den beiden Überexpressionsstämmen von scr4632 und scr6925 könnte auf eine direkte Interaktion der beiden sRNA-Sequenzen miteinander zurückzuführen sein.

3.7.3.2 Sequenzierung der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925

Das Genom der Deletionsstämmen von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) konnte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Kalinowski an der Universität Bielefeld sequenziert werden.

Für beide Stämme konnte gezeigt werden, dass die Plasmide genau wie beabsichtigt in das Genom integriert hatten. Beide Plasmide integrierten in den 1000 bp langen *upstream*-Bereich der sRNAs. Wie in Abbildung 3.69 dargestellt, integrierte das Plasmid pCK_4del in den *upstream*-Bereich der sRNA scr4632 und pCK_6del in den *upstream*-Bereich der sRNA scr6925. Der in beiden

Stämmen beobachtete goldene Phänotyp wurde also nicht durch eine mögliche unspezifische Integration der Plasmide an einem anderen *locus* induziert.

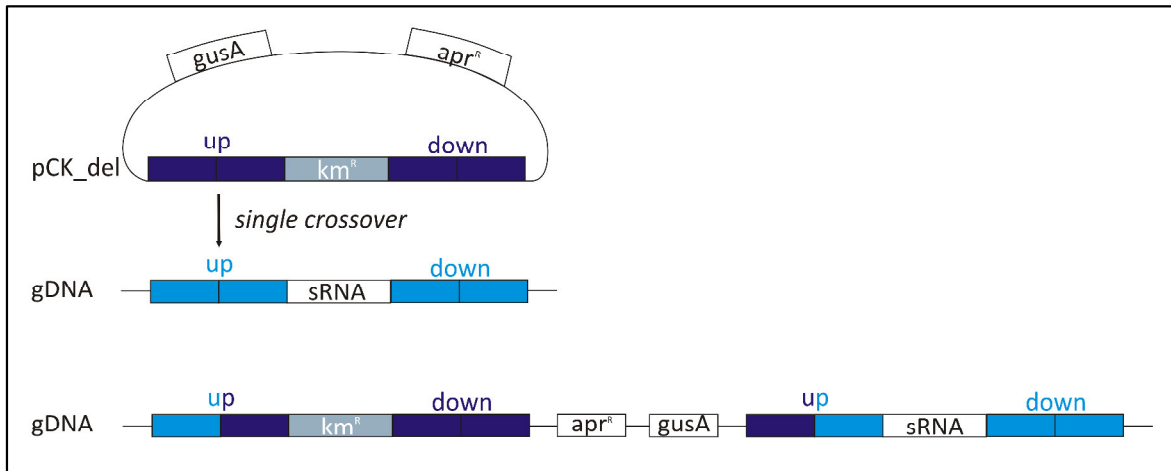


Abbildung 3.69: Sequenzierung der genomischen DNA der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

Die Sequenzierung des Genoms der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 ergab für beide konjugierten Plasmide die Insertion an der gewünschten Stelle direkt an der sRNA-Sequenz.

Die zuvor untersuchte Expression der sRNAs der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) bestätigte das Ergebnis der genotypischen Bestimmung durch die AG Kalinowski in Bielefeld. Es zeigte sich auch im Expressionslevel, dass das jeweilige Deletionsplasmid zwar in das Genom integriert, aber kein *double crossover* durch homologe Rekombination stattgefunden hatte.

3.7.3.3 Auswirkungen durch die Insertion der Deletionsplasmide verdoppelter Gene

Für die Amplifikation der *upstream*- und *downstream*-Bereiche der sRNAs für die Herstellung der Deletionsplasmide mussten die Oligonukleotide variabel gelegt werden, um Sequenzen verwenden zu können, die nur einmal im Genom vorkommen. Die Länge der amplifizierten Fragmente variierte deshalb. Für die Amplifikation der Bereiche um scr6925 wurden 1110 bp *upstream* und 1037 bp *downstream* ausgewählt. Die Gene SCO6924, ein hypothetisches DNA-bindendes Protein, und SCO6925, ein vorhergesagtes Membranprotein, waren in diesen Sequenzbereichen vollständig enthalten. Mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) sollten die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse bestätigt und die Expression der mRNA-Transkripte für diese beiden Gene ermittelt werden, da die erhöhte Transkriptmenge für den Phänotyp verantwortlich sein könnte (Abb. 3.70).

Die Analyse der Expression von SCO6924 ergab eine etwa 3fache Hochregulierung der mRNA, bei SCO6925 konnte sogar eine 15fache Erhöhung der Transkriptmenge detektiert werden (Abb. 3.71). Die Menge der mRNA von SCO6925 variierte stark, doch selbst die geringste festgestellte Menge ergab noch eine Erhöhung des Transkripts um das 10fache. Bei der Detektion beider Transkripte in WT-cDNA und von SCO6924 in 6delP-cDNA zeigten sich nur sehr geringe Schwankungen der ermittelten Transkriptmengen.

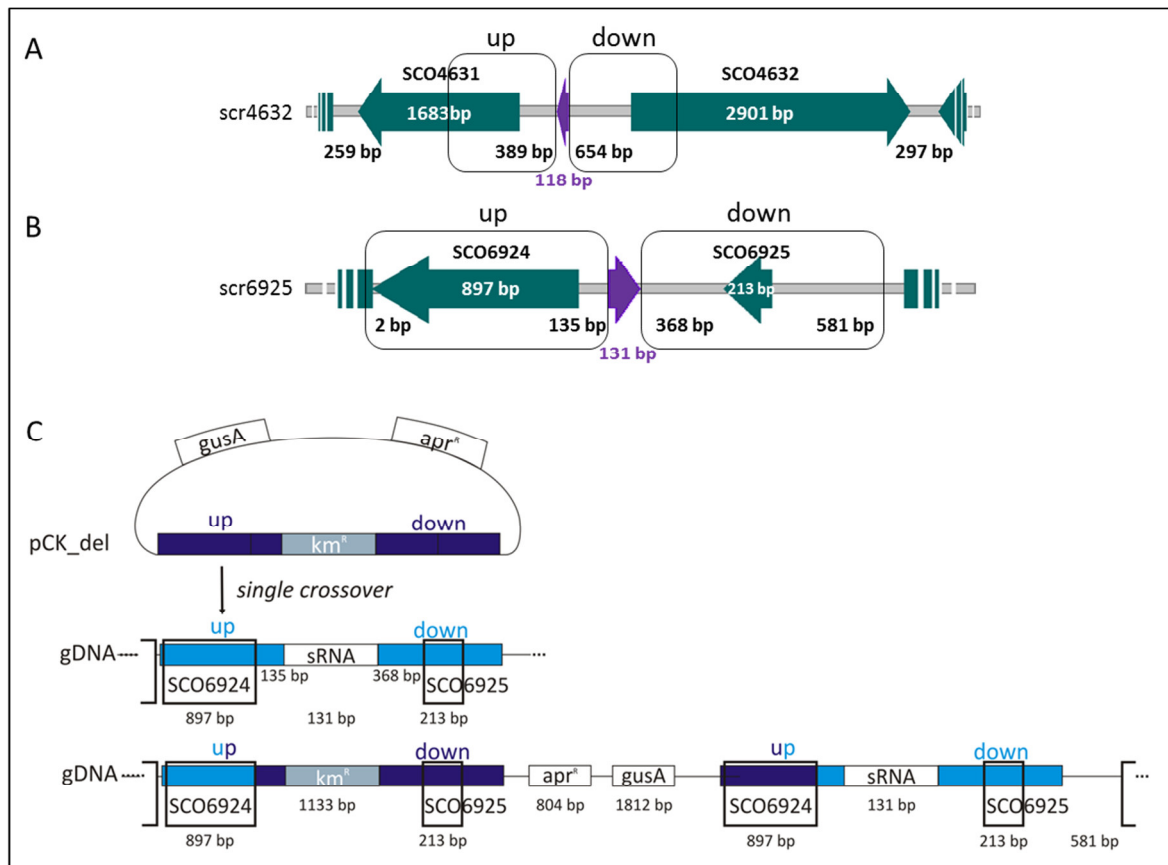


Abbildung 3.70: Bereiche der Insertion der Deletionsplasmide von scr4632 und scr6925

Für die Erstellung der Deletionsplasmide wurden je 1000 bp *upstream* und *downstream* der sRNAs amplifiziert und um eine Kanamycin-Resistenz inseriert. **A** Bei scr4632 beinhalten diese Fragmente nur Teile von Genen. **B** Die Fragmente bei scr6925 enthalten zwei vollständige Gene (SCO6924 und SCO6925). **C** Durch die Insertion des Plasmids liegen diese Gene verdoppelt vor.

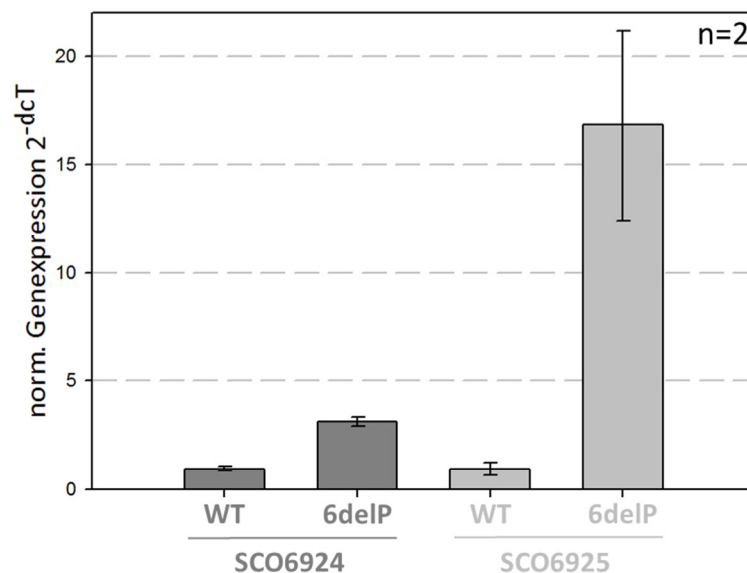


Abbildung 3.71: Expressionsanalyse der Gene SCO6924 und SCO6925 in Wildtyp-Zellen und im Deletionsstamm von scr6925

Die Zellen wurden auf Soja-Mannitol-Festmedium angezogen und die isolierte RNA für eine cDNA-Synthese und anschließende quantitative *Real-Time-PCR* verwendet. In 6delP liegt SCO6924 etwa 3fach erhöht vor, SCO6925 wird sogar etwa 15fach exprimiert.

3.7.3.4 Direkte Interaktion der sRNAs scr4632 und scr6925 – *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Ein Gelverzögerungsexperiment wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die sRNA-Sequenzen von scr4632 und scr6925 direkt miteinander interagieren können.

In vitro transkribierte, radioaktiv markierte scr4632^{32P} RNA wurde mit scr6925 RNA inkubiert und die Komplexbildung auf einem nativen 6% Polyacrylamidgel untersucht. Des Weiteren wurde radioaktiv markierte scr6925^{32P} RNA mit scr4632 RNA inkubiert und ebenfalls auf ein natives 6% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die jeweils miteinander inkubierten Transkripte bildeten keinen spezifischen Komplex bei einer Inkubation bei 28°C (Abb. 3.72). Die Ursache des Verschwindens der Bande oberhalb des Transkriptes von scr6925 (Abb. 3.72 Pfeil) ist noch zu ermitteln.

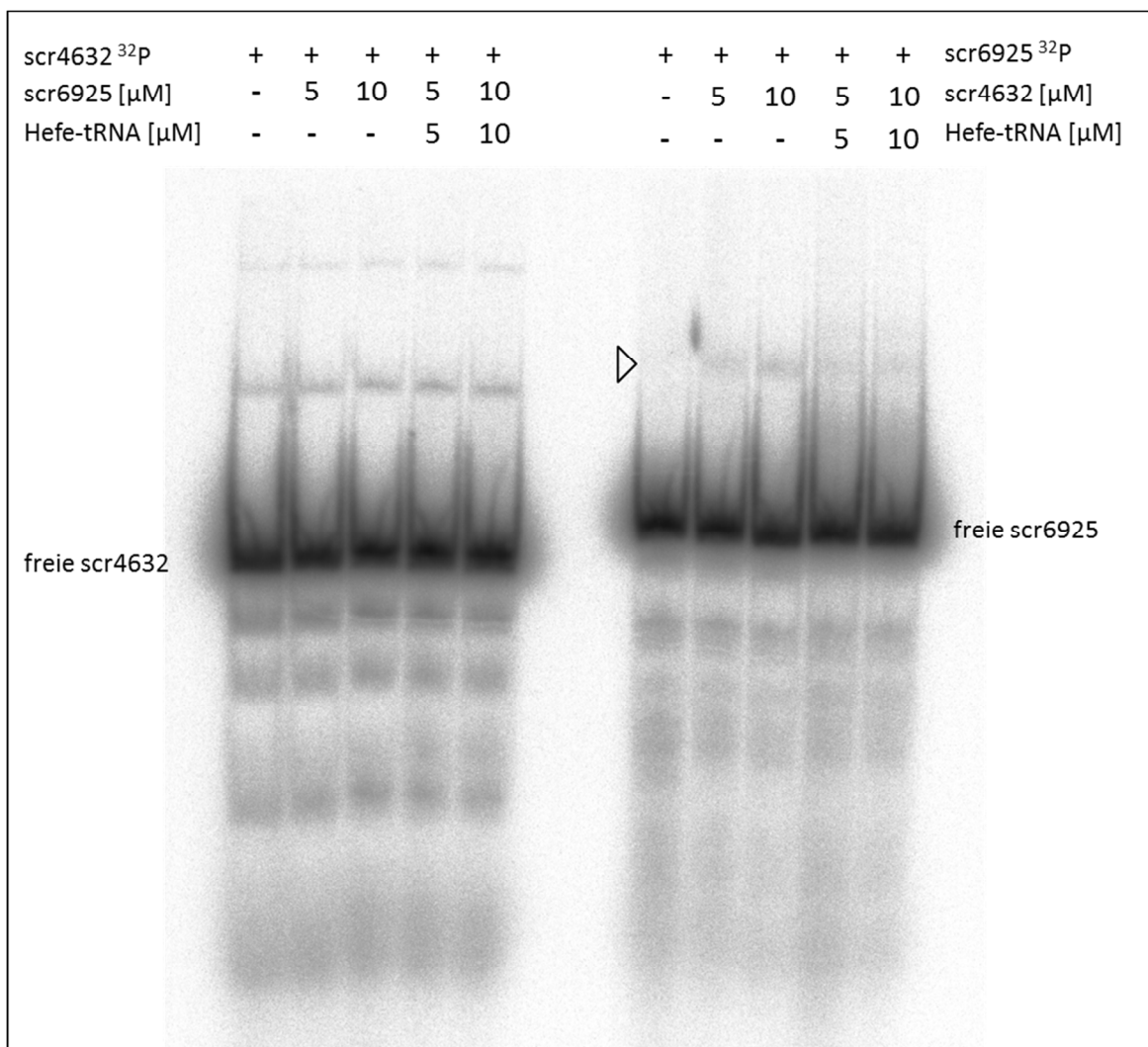


Abbildung 3.72: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit Transkripten von scr4632 und scr6925

Gelverzögerungsexperiment der sRNAs scr4632 (links) und scr6925 (rechts) mit steigenden Mengen RNA (scr6925 bzw. scr4632). Radioaktiv markierte RNA wurde mit unterschiedlichen Mengen der jeweils anderen RNA inkubiert und die Komplexbildung auf einem nativen 6% Polyacrylamidgel verfolgt. Als Kontrolle wurde Hefe-tRNA mitgeführt. Es zeigt sich keine Verzögerung von RNA-Komplexen durch die Interaktion der sRNAs miteinander bzw. mit Hefe-tRNA. Der Pfeil markiert ein sich veränderndes Bandenmuster, dessen Ursprung noch geklärt werden muss.

Neben den Hauptbanden der sRNA-Transkripte waren auf dem Gel noch einige kleinere und größere Banden zu erkennen. Deren Ursprung sollte in Kontrollgelen unter denaturierenden und nativen Bedingungen geklärt werden. (Abb. 3.73). Bei den Banden, die größer sind als die sRNA-Transkripte, handelte es sich vermutlich um Dimere. Im denaturierenden Gel traten sie nicht mehr auf bzw. waren vermindert. Bei den unterhalb der sRNA-Transkripte aufgetretenen Banden handelte es sich vermutlich um Abbauprodukte der sRNAs.

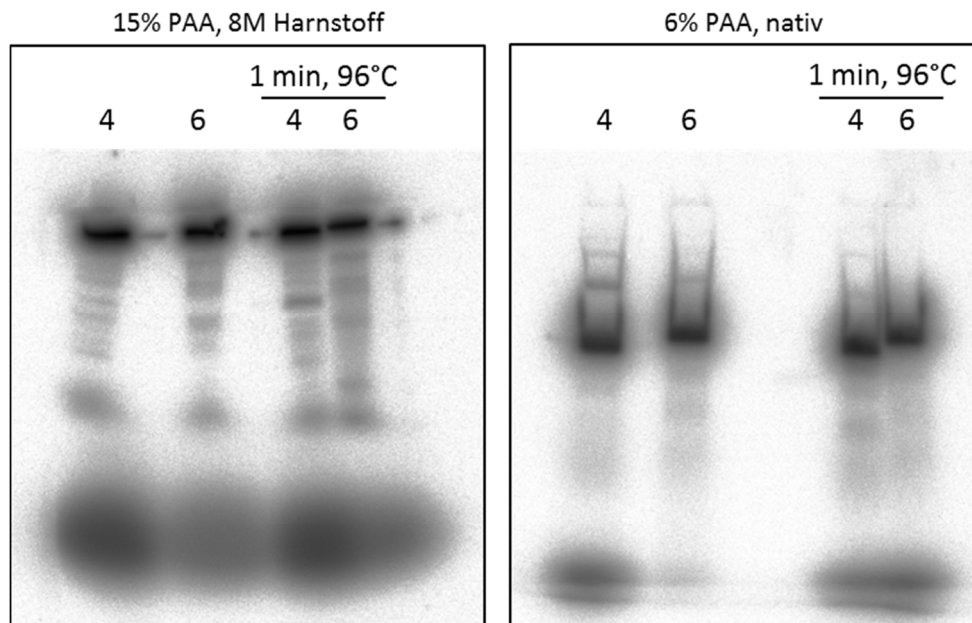


Abbildung 3.73: Kontrollgele der Transkripte von scr4632 und scr6925

Im denaturierenden (links) und nativen Polyacrylamidgel (rechts) wurde das Verhalten der Transkripte von scr4632 (4) und scr6925 (6) im nicht aufgekochten und aufgekochten Zustand (1 min, 96°C) überprüft. Im denaturierenden Gel traten vermehrt kleinere Transkripte auf, im nativen Gel dimerisierten die Transkripte ohne oder bei unzureichendem Aufkochen.

3.7.3.5 Zusammenfassung scr4632 und scr6925

In den Deletionsstämmen von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) hatte kein *double crossover* stattgefunden. Die zu deletierenden sRNA-Sequenzen waren immer noch im Genom enthalten. Die Deletionsplasmide hatten in das Genom integriert und im Fall von 6delP die benachbarten Gene von scr6925 verdoppelt. Bei 4delP wurden mit dem Plasmid nur Genfragmente inseriert. Durch die Integration der Plasmide wurde in beiden Deletionsstämmen ein gleicher Phänotyp induziert, bei dem sie schneller wuchsen, mehr Myzelien und Sporen produzierten sowie eine goldfarbene Substanz sezernierten. Die Substanz zeigte keine antibiotische Wirkung. Eine Überexpression der sRNA-Sequenzen konnte den Phänotyp nicht auslösen. Die Klärung der Ursache des Phänotyps sowie die Determinierung der Zusammensetzung der goldenen Flüssigkeit stehen noch aus.

4 Diskussion

Die Aufklärung der Funktionsweise und die Identifikation von Zielgenen von sRNAs aus dem Genom von *S. coelicolor* waren das Ziel dieser Arbeit. Im Jahr 2011 wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Hochdurchsatzsequenzierung des Transkriptoms von *S. coelicolor* die Existenz von verschiedenen sRNA-Transkripten ermittelt und deren Expression durch Northern Blot-Analyse verifiziert. (Vockenhuber *et al.*, 2011) Die Charakterisierung der ausgewählten sRNAs sollte nun durch Expressionsanalyse der Transkripte in verschiedenen Wachstumsphasen, unter diversen Nährstoffangeboten und Stressbedingungen erfolgen. Eine phänotypische Studie von Überexpressions- und Deletionsmutanten von sieben verschiedenen sRNAs wurde auf verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Supplementen durchgeführt. Zudem wurde der Einfluss von Metallionen auf das Wachstum untersucht.

4.1 Auswahl von sRNA-Kandidaten für diese Arbeit

Die für diese Arbeit ausgewählten sRNA-Kandidaten zeigten sich hinsichtlich ihres hohen Expressionslevels (scr2736) und ihrer wuchsphasenabhängigen Expression (scr2952, scr4115, scr4389, scr4632, scr6925) als besonders interessant. Die Expression in einer späteren Wachstumsphase kann auf die regulatorische Funktion in Differenzierungsprozessen des reiferen Myzels hinweisen. Eine Beteiligung an der Regulation der Sekundärmetabolit-Produktion ist ebenfalls möglich. Auch die konstante Expression von scr3920 in allen Wachstumsphasen wurde als interessant angesehen. Eine konstante Expression kann bedeuten, dass die sRNA an der Regulation eines durchgängig aktiven *housekeeping*-Prozesses beteiligt ist. Gleiches gilt für die sehr hohe Expression von scr2736. Sie reguliert eventuell eine ubiquitär vorkommende mRNA und steht deshalb in großen Mengen zur Verfügung (Abb. 4.1).

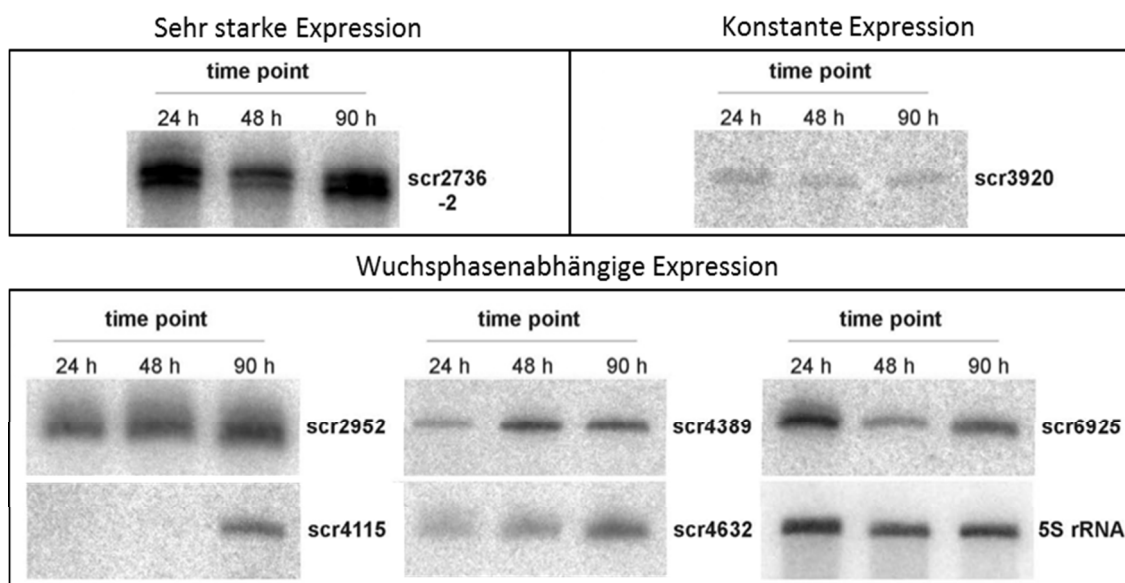


Abbildung 4.1: Expression der sRNA-Kandidaten

Die Expression der ausgewählten sRNA-Kandidaten in 3% TSB-Flüssigkultur. Die interessanten Merkmale der regulatorischen RNAs sind starke oder konstante Expression in allen Wachstumsphasen bzw. wuchsphasenabhängige Expression. Entnommen und bearbeitet nach Vockenhuber *et al.*, 2011.

S. coelicolor bietet mit seiner komplexen morphologischen Differenzierung und der großen Anzahl produzierter Sekundärmetaboliten vielfältige Regulationsmöglichkeiten für nicht-kodierende RNAs. Deshalb ist die Zuordnung einer Funktion der untersuchten sRNAs von wissenschaftlichem Interesse.

4.1.1 Genomische Konservierung der sRNA-Kandidaten

Literaturstudien zeigen, dass konservierte sRNAs in verschiedenen Organismen vergleichbare aber auch verschiedene Funktionen ausführen können. Ein hoher Grad der Konservierung einer sRNA innerhalb einer Gattung spricht eher für eine konservierte Funktion als im Vergleich zu einer Sequenzkonservierung evolutionär weiter entfernter Organismen. (Zhang *et al.*, 2004) Für eine konservierte Funktion der sRNA ist nicht unbedingt die Konservierung der ganzen Sequenz nötig. Peer & Margalit beschrieben 2011, dass sRNA-Bindemotive, die die Interaktion zu ihren Ziel-mRNAs vermittelten, stark konserviert waren, während die restliche Sequenz der sRNAs sich unterschied. (Peer & Margalit, 2011) Die in vielen verschiedenen Organismen konservierte 6S RNA reguliert jeweils die RNA-Polymerase, obwohl ihre Sequenz nur sehr wenig konserviert ist. Hier vermittelt die konservierte Struktur der sRNA die Funktion. (Gottesman & Storz, 2011; Panek *et al.*, 2008)

Die in *E. coli* gefundene sRNA Spot42 ist in allen Enterobakterien hochkonserviert. (Gottesman & Storz, 2011) In *E. coli* reprimiert die sRNA die Translation der mRNA *galk* und reguliert mindestens 14 weitere in Kohlenstoffaufnahme und -metabolismus involvierte Operons. (Beisel & Storz, 2011; Hansen *et al.*, 2012) In *Aliivibrio salmonicida* aus der Familie der *Vibrionaceae*, die ebenfalls zu den Enterobakterien gehören, gibt es kein Galactose-Operon. Die Sequenz der sRNA ist jedoch hochkonserviert. Hansen *et al.* konnten 2012 zeigen, dass Spot42 in *A. salmonicida* vermutlich Pirin, den Schlüsselregulator des Pyruvadehydrogenase-Komplexes, reprimiert. (Hansen *et al.*, 2012) Hier werden durch die gleiche sRNA unterschiedliche Prozesse reguliert. Im gleichen Jahr jedoch zeigten Kim *et al.*, dass viele sRNAs wie RprA, ArcZ oder SgrR aus *Klebsiella pneumoniae* (einem Enterobakterium) die gleichen regulatorischen Funktionen ausführten wie in *E. coli*. (Kim *et al.*, 2012)

Die Gattung *Streptomyces* umfasst sehr viele Arten, deren Genom meist noch nicht sequenziert ist. Für 31 Streptomyceten stehen derzeit vollständig sequenzierte Genome zur Verfügung. Von weiteren 174 Arten sind Teile des Genoms sequenziert (Microbial Genomes, NCBI; [H5]). Die BLAST-Suche beinhaltete acht weitere Streptomyceten der Arten *Streptomyces* sp., deren vollständiges Genom zur Verfügung steht, die jedoch nicht auf der Seite des Genome Browser aufgeführt sind [H1]. Die in dieser Studie untersuchten sRNA-Transkripte sind sehr unterschiedlich konserviert. Die höchste Konservierung wurde für scr2952 in 39 verschiedenen Arten (inklusive deren Subspezies) festgestellt, gefolgt von scr2736 (35 Streptomyceten), scr3920 und scr4115 (je 29 Streptomyceten) und scr4389 (19 Streptomyceten). Dem entgegengesetzt wurde scr4632 nur in *S. coelicolor* ermittelt. scr6925 wurde in 10 Streptomyceten gefunden (Tab. 3.1). Die sRNA-Konservierungen sind im Anhang, Kapitel 6.3.2, aufgeführt.

Die sRNA scr2952 konnte als einzige sRNA in einer anderen Gattung der Familie *Streptomycetaceae* gefunden werden. Sie ist auch in *Kitasatospora setae* aus der Gattung *Kitasatospora* vorhanden. Die Konservierung der Sequenz zwischen den beiden Organismen liegt

mit 85 von 92 bp bei 92%. (Anhang, Abb. 6.9). scr2952 wurde zudem in nahezu allen untersuchten Streptomycceten-Arten identifiziert.

scr5239 ist die einzige, bislang gut charakterisierte sRNA in Streptomycceten (Kapitel 2.3.1.6). Sie gilt als zu 55% konserviert und reguliert die nur in *S. coelicolor* vorkommende Agarase *dagA*, obwohl die sRNA-Sequenz auch in anderen Streptomycceten konserviert ist. (Vockenhuber & Suess, 2012) Zudem reguliert scr5239 noch die Methionin-Synthase *metE*, die interessanterweise im Kontrast zu *dagA* auch in anderen Streptomycceten - über *S. coelicolor* und die Gattung *Streptomyces* hinaus – konserviert ist. (Vockenhuber *et al.*, 2015)

scr4632, die nur in *S. coelicolor* gefunden wurde, muss also nicht unbedingt einen Mechanismus regulieren, der nur in *S. coelicolor* vorkommt. Sie kann auch eine alternative Regulation eines bekannten Mechanismus ausführen. Es wird interessant sein, in Zukunft aufgeklärte Funktionen mit der Konservierung der sRNAs zu vergleichen und festzustellen, ob die gleiche sRNA-Sequenz in unterschiedlichen Organismen gleiche oder verschiedene Funktionen ausübt.

4.1.2 Genomische Lage der sRNA-Kandidaten

Die Lage einer sRNA im Genom könnte ein Hinweis auf die Wichtigkeit der von ihnen ausgeführten Regulation geben, da das Genom von *S. coelicolor* eine klare Einteilung in essentielle und weniger essentielle Gene besitzt. scr5239 wird in der Kern-Region des Genoms kodiert (Abb. 4.2). Für die sRNA konnten zwei Ziel-mRNAs identifiziert werden. Die Agarase *dagA*, die nur in *S. coelicolor* vorkommt und die Methionin-Synthase *metE*, die in vielen Streptomycceten konserviert ist. *MetE* nimmt eine bedeutende Rolle bei der Methionin-Synthese ein. Sie katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe von N^5 -Methyltetrahydrofolat auf Homocystein. Das entstandene Methionin kann weiter zu S-Adenosylmethionin umgesetzt werden, einem wichtigen Methylgruppen-Donor im Stoffwechsel. Die im Kerngenom kodierte sRNA scr5239 reguliert demnach eine nicht essentielle Funktion (*dagA*) und elementare Stoffwechselprozesse gleichermaßen. (Vockenhuber *et al.*, 2015; Vockenhuber & Suess, 2012)

Die in *S. coelicolor* vorkommenden Sigmafaktoren (65 Stück) sind über das ganze Genom verteilt kodiert. Die Sigmafaktoren SigB (osmotischer Stress und Differenzierung) und SigG (genaue Funktion ungeklärt) finden sich bspw. in der linken bzw. rechten Arm-Region des Genoms. Die Sigmafaktoren HrdA (morphologische Differenzierung, Antibiotikaproduktion), SigR (oxidativer Stress), SigF (Sporenmaturation), WhiG und BldN (Differenzierungsprozesse) sowie HrdB (essentieller Haupt-Sigmafaktor) werden über die gesamte Kern-Region verteilt kodiert (Abb. 4.2). Eine spezifische Anreicherung dieser Regulatoren in einer bestimmten Region des Genoms konnte nicht ermittelt werden. (Bibb & Buttner, 2003; Buttner & Lewis, 1992; Catakli *et al.*, 2005; Kormanec *et al.*, 1999; Paget *et al.*, 1998)

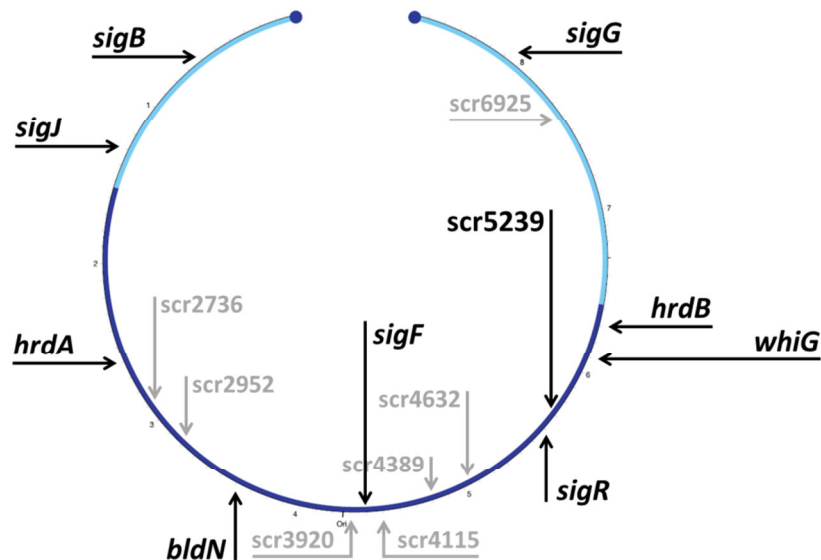


Abbildung 4.2: Lage der sRNAs im Genom von *S. coelicolor*

Die in dieser Arbeit untersuchten sRNAs sind in grau eingezeichnet. Sechs von ihnen sind in der Kern-Region (dunkelblau) des Chromosoms lokalisiert. Nur eine der sRNAs (scr6925) ist in der äußeren Arm-Region (hellblau) kodiert. Die sRNA scr5239 ist ebenfalls in der Kern-Region lokalisiert. Sigmafaktoren (kursiv) werden in allen Regionen des Genoms von *S. coelicolor* kodiert. Entnommen und bearbeitet nach Bentley *et al.*, 2002.

Bei den Expressions- und Wachsanalysen konnten keine ausgeprägten oder ungewöhnlichen Phänotypen für die in der Kern-Region kodierten sRNAs dieser Studie beobachtet werden (Kapitel 3.4 und Kapitel 3.6). Dies muss aber nicht bedeuten, dass diese sieben sRNAs keine wichtigen Funktionen beeinflussen. Vielmehr ist zu vermuten, dass die passenden Versuchsbedingungen, die zur Induktion oder Repression der Expression einer der sRNAs führen, nicht identifiziert werden konnten.

Das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* hat ein zirkuläres, 4,2 Mbp großes Chromosom. Der gemittelte GC-Gehalt beträgt 43,5 %, variiert aber innerhalb der genomischen Sequenz deutlich. Das Chromosom wird bidirektional vom Replikationsursprung (*oriC*) repliziert. Die Replikation endet am leicht von der Mitte verschobenen Terminationspunkt (*terD*) bei ca. 2,0 Mbp (Abb. 4.3 A). Es wurden drei Klassen von Genen identifiziert. Klasse 1 umfasst in die Sporulation involvierte Gene, Klasse 2 Gene exponentieller Wachstumsbedingungen, der Transkription und Translation, des Stoffwechsels und von Stress-Proteinen. In Klasse 3 sind hauptsächlich Gene nicht identifizierter Funktion zusammengefasst. Es ist keine Akkumulation der Gene dieser Klassen in einem bestimmten Genabschnitt bekannt, auch wenn die Dichte der genetischen Kodierung variiert. Auf dem Plusstrang sind auf den ersten etwa 2 Mbp besonders viele Gene kodiert, während auf dem Minusstrang ab 2,0 Mbp die Dichte der kodierten Gene höher ist. (Kunst *et al.*, 1997)

Im Jahr 2010 wurden 67 neue sRNA-Kandidaten in *B. subtilis* ermittelt. Von diesen sRNAs wurden 16 sRNAs in aus Phagen stammenden *loci* kodiert. Die Verteilung der sRNA-Lokalisation im nicht aus Phagen stammenden Chromosom wurde nicht untersucht (Abb. 4.3 B). (Irnov *et al.*, 2010)

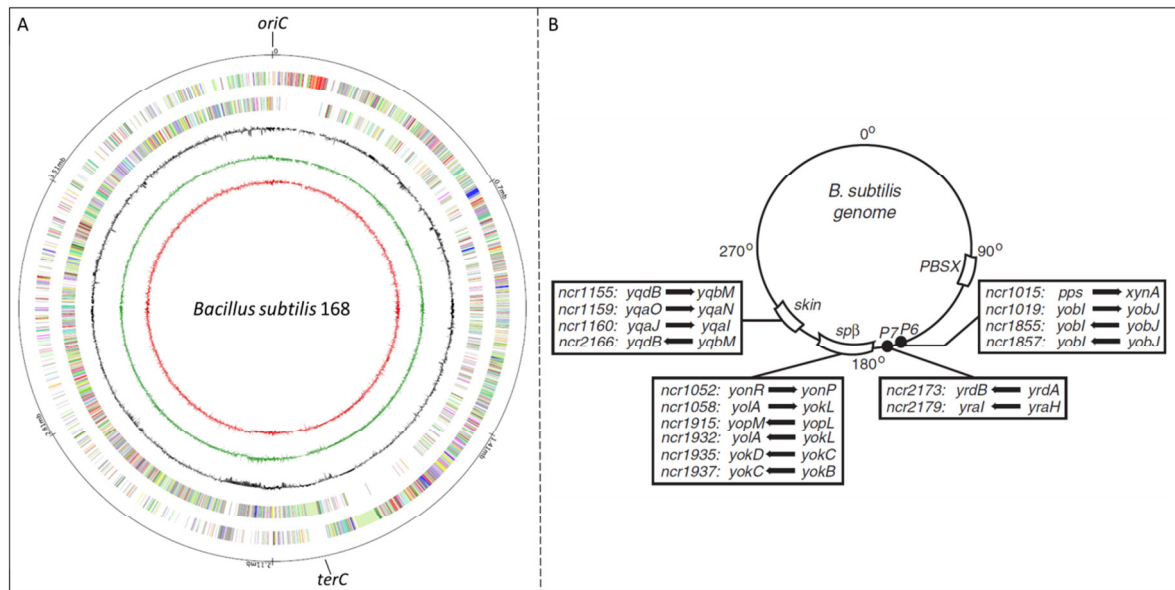


Abbildung 4.3: Chromosomale Organisation *B. subtilis*

A Der äußerste Ring des Schemas markiert die Skalierung der Basenpaare des Genoms. Der zweite Ring (von außen) zeigt die Verteilung der Gene auf dem Plusstrang, der dritte Ring die des Minusstrangs. Der vierte Ring (schwarz) zeigt die prozentuale Verteilung der GC-Basen. Auf dem fünften, grünen Ring ist der Gebrauch von GC-Basenpaarungen dargestellt, auf dem sechsten Ring (rot) der Gebrauch von AT-Basenpaaren. Replikationsursprung (*oriC*) und Terminationspunkt (*terD*) sind eingezeichnet [H6]. **B** 16 sRNA-Kandidaten aus von Phagen abstammenden Gen/*loci*. Der Pfeil symbolisiert die sRNA, die Richtung die Kodierung auf dem Plus- (rechts) oder Minusstrang (links). Die sRNA ist zwischen den sie umgebenden Genen aufgelistet. Entnommen und bearbeitet nach Irnov *et al.*, 2010.

Das Genom des 4,6 Mbp großen, Gram-negativen Bakteriums *E. coli* ist in die vier Makrobereiche Ori, Left, Right und Ter sowie zwei nicht strukturierte Regionen NS-left und NS-right unterteilt. Der Ori-Bereich mit dem Replikationsursprung (*oriC*) stellt den Ausgangspunkt der bidirektionalen Replikation dar. Der Ter-Bereich sitzt diesem gegenüber und beinhaltet den Terminator der DNA-Replikation und die *dif*-Gene der Chromosomensegregation. Die vier übrigen Regionen bilden zwei Arm-Regionen links (Left und NS-left) und rechts (Right und NS-right) des Replikationsursprungs. Das Genom von *E. coli* ist in zwei Arm-Regionen (Replichore) unterteilt. Dieser Einteilung liegt jedoch keine funktionelle Aufteilung zugrunde, sondern die bidirektionale Replikation. Die an der Replikation beteiligten Proteine sind entlang der Replikationsrichtung über das gesamte Chromosom verteilt. Es ist keine Kondensation wichtiger Gene in einer Kern-Region um den Replikationsursprung wie bei *S. coelicolor* feststellbar (Abb. 4.4 A).

In *E. coli* konnten durch vergleichende Studien sRNAs mit essentieller und nicht essentieller Funktion identifiziert werden. Während die essentiellen sRNAs in vielen Genomen verschiedener *E. coli*-Stämme konserviert waren, konnte man die variablen sRNA-Sequenzen in nur wenigen Arten ermitteln. Eine Verbindung der regulatorischen Fähigkeit oder der Wichtigkeit der regulierten Funktion mit dem genetischen *locus* der sRNA konnte nicht gefunden werden. Ebenso wenig wie eine Verbindung mit der Lokalisation auf dem kontinuierlich oder diskontinuierlich replizierten DNA-Strang festgestellt wurde (Abb. 4.4 B). (Hershberg *et al.*, 2003; Skippington & Ragan, 2012)

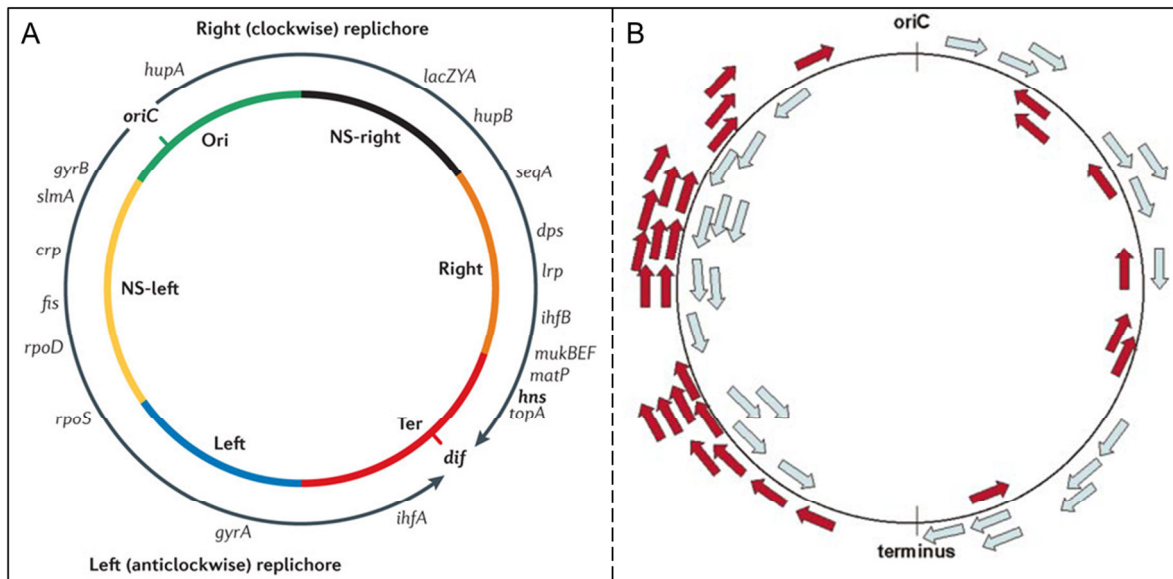


Abbildung 4.4: Chromosomale Organisation von *E. coli*

A Das zirkuläre Genom von *E. coli* ist in vier Makrodomänen Ori (grün), Left (blau), Right (orange) und Ter (rot) unterteilt. Zwei weitere Bereiche sind nicht strukturiert (NS-left, gelb und NS-right, schwarz). Einige Gene von Schlüsselproteinen der Replikationsmaschinerie sind entlang der Replikationsrichtung (schwarze Pfeile) aufgeführt. **B** Verteilung von sRNA-Genen im Chromosom von *E. coli*. Gene auf dem kontinuierlich replizierten Strang sind rot eingezeichnet, diskontinuierlich replizierte Gene in grau. Entnommen und bearbeitet nach Dorman, 2013; Hershbarg *et al.*, 2003.

In keinem der drei untersuchten Organismen konnte eine distinkte Verteilung der sRNA-*loci* im Genom festgestellt werden. Eine Verbindung ihres genetischen *locus* mit der Relevanz ihrer regulierten Funktion konnte ebenfalls nicht ermittelt werden.

4.1.3 Sekundärstrukturen der sRNA-Kandidaten

Die Sekundärstruktur einer sRNA ist essentiell für die Initiation von Basenpaarungen mit ihrer Ziel-mRNA. Die Interaktion beginnt meist über die Interaktion von *loop*-Regionen. Diese Interaktion kann aus nur einem oder mehreren terminalen *loops* bestehen, wie bei der Basenpaarung der sRNA RNAIII mit ihren Ziel-mRNAs *spa* (ein *loop* interagiert) oder *rot* (zwei *loops* interagieren) (Abb. 4.5 A). Für die Bindung der sRNA RhyB sorgt die Anlagerung des vermittelnden Hfq-Proteins für eine Umfaltung der mRNA *sodB*, woraufhin sich ein sehr großer *loop* in der Struktur bildet. Dieser dient als Plattform für die sRNA-mRNA-Bindung (Abb. 4.5 B). Nicht immer wird die Bindung einer sRNA an die Ziel-mRNA durch eine *loop*-Struktur vermittelt. Im Fall der sRNA MicA bindet diese in einer einzelsträngigen Sequenzregion an die mRNA *ompA* (Abb. 4.5 C). Da auch diese Interaktion Hfq-vermittelt abläuft, ist es wahrscheinlich, dass das Protein die Bindestelle strukturell vorbereitet. In *S. coelicolor* ist bislang kein Hfq-ähnliches Protein bekannt. Wie genau die Bindung von sRNAs an ihre Ziel-mRNA *in vivo* abläuft, ist noch im Detail zu klären. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der sRNA scr5239 mit ihren beiden Ziel-mRNAs über das Aufschmelzen einer 17 bp langen Stammschleife der Sekundärstruktur erfolgt (Abb. 4.5 D). Andere sRNA-mRNA Interaktionen konnten in Streptomycceten bislang nicht nachgewiesen werden. (Vockenhuber *et al.*, 2015; Vockenhuber & Suess, 2012)

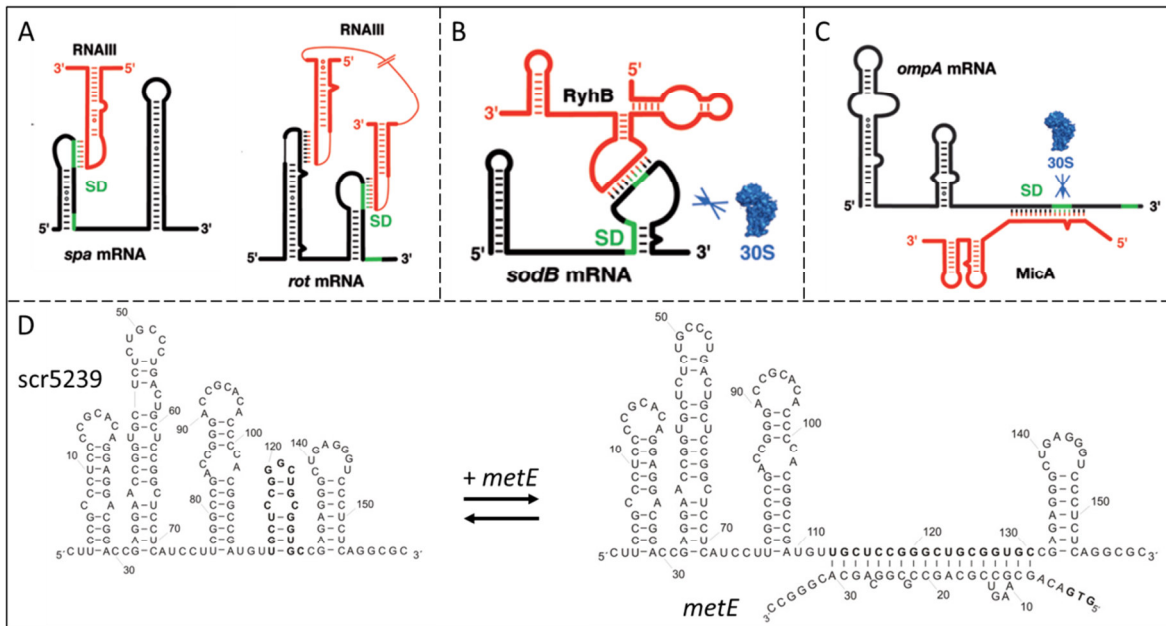


Abbildung 4.5: Interaktionsmechanismen von sRNA und mRNA

A Interaktion der RNA III mit ihrer Ziel-mRNA *spa* durch Wechselwirkung von je einem *loop* der RNAs. Es können auch zwei *loops* beider RNAs gleichzeitig beteiligt sein wie bei der Interaktion von RNA III mit der mRNA *rot*. **B** Hfq-vermittelte Interaktionen. Mit Hilfe des Proteins Hfq verändert sich die Struktur der mRNA *sodB*, sodass die sRNA RhyB mit einem großen *loop* an die freie Bindestelle über dem Startcodon binden kann. **C** Die sRNA MicA bindet ohne die Beteiligung einer *loop*-Region, aber auch Hfq-vermittelt, an die Ziel-mRNA *ompA*. **D** Interaktion der sRNA scr5239 aus *S. coelicolor* mit der mRNA *metE*. Entnommen und bearbeitet nach Geissmann *et al.*, 2009; Vockenhuber *et al.*, 2015.

Die Sekundärstrukturen aller untersuchten sRNAs zeigten eine hochstrukturierte Ausprägung, wie sie bei regulatorischen RNAs üblicherweise beobachtet wird (Kapitel 3.2.2). (Brantl, 2007) Sowohl Stammschleifen als auch ungepaarte Bereiche liegen in den Strukturvorhersagen der sRNAs vor und könnten die Interaktion mit einer Ziel-mRNA ausführen (Abb. 4.6).

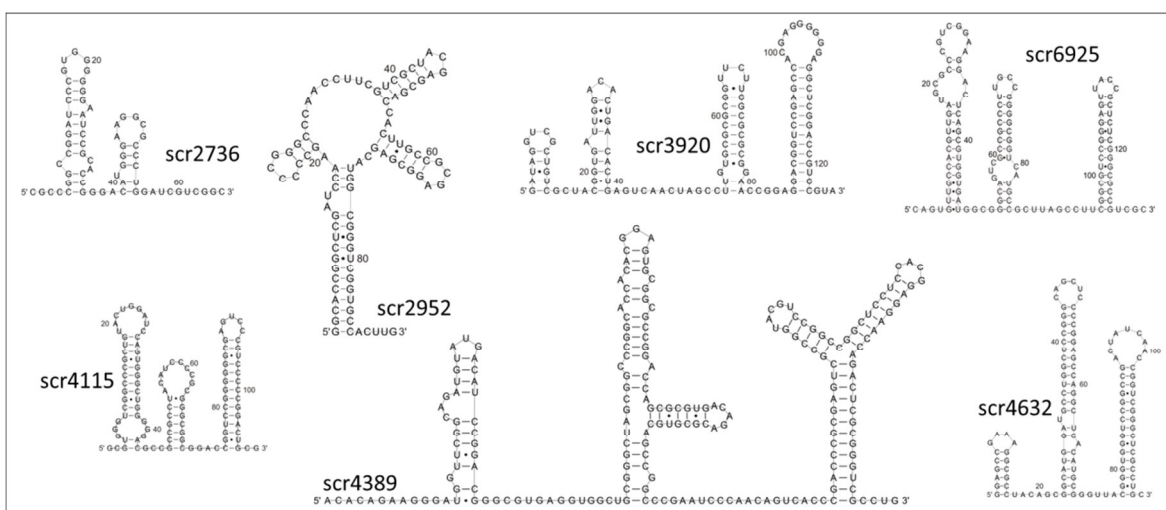


Abbildung 4.6: Sekundärstrukturen der sRNA-Kandidaten

Die Strukturen der sieben bearbeiteten sRNAs wurden mit Hilfe der Faltungsprogramme *RNAfold* und *mfold* erstellt. [H4, H7]

4.2 Expressionsanalyse der sRNAs scr4632 und scr6925 in Flüssigmedium

Die wuchsphasenabhängige Expression der beiden sRNAs scr4632 und scr6925 konnte bereits in der ersten Transkriptomstudie festgestellt werden. (Vockenhuber *et al.*, 2011) In dieser Studie wurde nun die Expression dieser sRNAs detailliert bei Zugabe unterschiedlicher Nährstoffe und unter Stressbedingungen untersucht (Kapitel 3.4). Während die angewendeten Stressbedingungen zu keiner signifikanten Expressionsänderung der sRNAs führte, sollen im Folgenden der Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffquellen auf das Expressionsmuster diskutiert werden.

4.2.1 Stickstoffquellen

sRNAs werden häufig mit der Stoffwechselregulation eines Organismus in Verbindung gebracht. (Michaux *et al.*, 2014) Deshalb wurde die Expression von scr4632 und scr6925 bei unterschiedlichen Nährstoffangeboten überprüft.

Stickstoff ist ein essentieller Nährstoff, da er für die Aminosäure-Synthese, den Sekundärmetabolismus und die Synthese der Purin- und Pyrimidin-Basen benötigt wird. Vor allem als Bodenbakterium ist *S. coelicolor* auf eine effiziente Stickstoffversorgung angewiesen, denn das besiedelte Bodensubstrat ist meist stickstoffarm. (Hodgson, 2000) Dies spiegelt sich unter anderem darin wider, dass *S. coelicolor* ungewöhnlich viele Glutaminsynthetasen besitzt. Wenigstens fünf verschiedene dieser Enzyme wurden identifiziert. (Fink *et al.*, 2002; Reuther & Wohlleben, 2007) In einer Stickstoffmangel-Situation wird Ammonium unter Energieverbrauch durch die Glutaminsynthetase (GS) und die Glutamat-2-Oxoglutarat-Transaminase (GOGAT) zu zwei Glutamat-Molekülen umgesetzt. Bei Stickstoff-Überschuss wird weniger Energie pro Ammoniumfixierung benötigt, dafür aber auch nur ein Glutamat gebildet (Abb. 4.7). (Reuther, 2008) Die Glutaminsynthetase wird bei Ammonium-Überschuss durch Adenylierung inaktiviert.

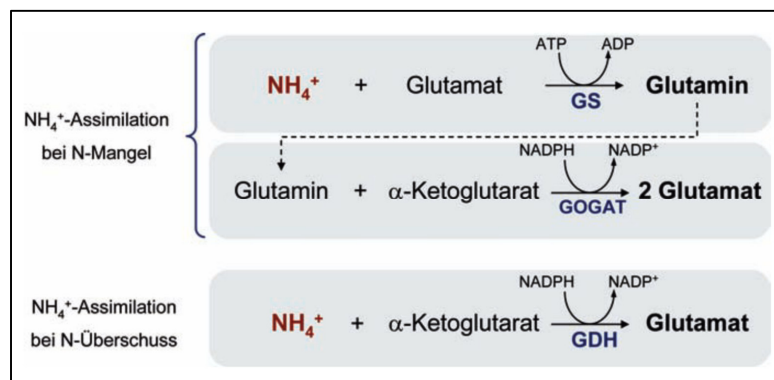


Abbildung 4.7: Schema der Stickstoff-Fixierung bei Stickstoff-Mangel und -Überschuss

Assimilation von Ammonium in Streptomyces bei Stickstoff-Mangel (N-Mangel) und -Überschuss (N-Überschuss). Bei N-Mangel liegt eine höhere Ausbeute der Fixierung vor, es wird jedoch mehr Energie dafür eingesetzt. GS: Glutaminsynthetase; GOGAT: Glutamat-2-Oxoglutarat-Transaminase; GDH: Glutamat-dehydrogenase Entnommen und bearbeitet nach Reuther, 2008.

Bei Wuchsbedingungen unter Zugabe von Glutamin oder Aminosäuren wird die Expression von *glnA* (Glutaminsynthetase I) reprimiert. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, sicher ist jedoch, dass Glutamin nicht über eine *feedback*-Hemmung die Expression von *glnA* inhibiert.

(Fisher & Wray, 1989) Der komplexe Stickstoff-Metabolismus stellt nicht nur die Versorgung mit Stickstoff sicher, sondern verknüpft zudem den Metabolismus mit der Ausdifferenzierung des Luftmyzels, der Sporenmaturation und der Antibiotikaproduktion. (Waldvogel *et al.*, 2011)

In Northern Blot-Analysen wurde die Expression von scr4632 und scr6925 unter Zugabe von Glutamin und Glutamat zum Medium überprüft. Da auch Aminosäuren als Stickstoffquelle genutzt werden können, wurde die Expression auch unter Zugabe von Casaminoäuren getestet (Abb. 3.7). (Merrick & Edwards, 1995) Casaminoäuren werden aus Casein gewonnen und enthalten alle Aminosäuren, wobei der Cystein- und Tryptophangehalt gering ist. Mit der Verwendung der Casaminoäuren sollten viele Aminosäuren gleichzeitig getestet werden, um bei einem Effekt später einzelne Aminosäuren zu überprüfen. Sowohl bei scr4632 als auch bei scr6925 verringerte sich die Expression unter Casaminoäuren deutlich, während nur scr6925 auf Glutamin reagierte. Glutamat hatte keinen Effekt.

Die Expression beider sRNAs wurde zudem unter Zugabe der einzelnen Aminosäuren Tryptophan, Methionin, Cystein und Lysin überprüft. Tryptophan, da es noch nicht durch die Casaminoäuren überprüft wurde, Methionin da es als Vorstufe von S-Adenosylmethionin eine Schlüsselrolle bei der Translationsinitiation und als Cofaktor im Aminosäure-Stoffwechsel spielt. In Streptomyceten kann Schwefel zwischen Cystein und Methionin übertragen werden. Cystein kann somit indirekt auf die gleichen von Methionin ausgeführten Funktionen einwirken. Lysin spielt bei der Synthese einiger Sekundärmetabolite eine Rolle und wurde deshalb einzeln getestet. Durch keine der Aminosäuren wurde das Expressionslevel beeinflusst. Auch die Zugabe der Stickstoffquellen Harnstoff und Ammoniumchlorid konnte keine Veränderung der Expression induzieren.

Beide sRNAs könnten an der Synthese einer der in Casaminoäuren enthaltenen Aminosäuren beteiligt sein. Auch die Beteiligung der sRNAs an Prozessen für welche die entsprechende Aminosäure benötigt wird, ist denkbar. Die Expression der sRNAs verringert sich (durch verminderte Expression oder schnellere Degradation des Transkripts), wenn die entsprechende Aminosäure vorliegt und nicht mehr synthetisiert werden muss. scr6925 könnte an der Regulation der Glutaminsynthetase beteiligt sein. Dieses Enzym wird unter Zugabe von Glutamin und Aminosäuren reprimiert, was zum beobachteten Expressionsmuster von scr6925 passt.

4.3 Wuchsanalysen auf Festmedium

4.3.1 Metallionenstress

Bei der Anzucht auf Festmedium konnten durch die Supplementierung von verschiedenen Metalllösungen über Filterplättchen für keine der sRNAs spezifische Effekte ausgelöst werden. Eine interessante Beobachtung soll hier dennoch diskutiert werden. Fünf der untersuchten Stämme (die Überexpressionen von scr2736, scr2952, scr3920, scr4115 und scr4389) zeigten ein gesteigertes Wachstum um den aufgelegten Filter mit Silbernitrat (Abb. 3.31 und 3.32). Nachdem dieser Phänotyp bereits in der ersten Versuchsdurchführung zu sehen war, wurde bei der Reproduktion Natriumnitrat mitgeführt. Um das Filterplättchen mit Natriumnitrat zeigte sich allerdings kein erhöhtes Wachstum. Es kann daher daraus geschlossen werden, dass die Induktion des Wachstums auf die Silberionen und nicht auf das Nitrat zurückzuführen ist.

Silber galt bereits in Zeiten des alten Ägypten als Medizin und wird heutzutage als antimikrobielle Substanz wiederentdeckt. Während die alten Griechen und Römer Silbergefäße für die Lagerung

von Trinkwasser nutzen, reicht die Verwendung von Silber-basierten Materialien heute von Implantations-Chirurgie und Wundverbänden über Nahrungsmittelverpackungen bis hin zu Wasserfilterungssystemen. Das Potential des Metallions rührt nicht nur von der Bioaktivität des Metalls selbst her, sondern auch von verschiedenen chemischen Aspekten wie der kristallographischen Struktur oder der erhöhten Reaktivität. (Pollini *et al.*, 2015) Es verwundert, dass ausgerechnet um dieses Metallion das Wachstum verstärkt war. Kupfer besitzt ähnliche Eigenschaften. Es wurde und wird ebenfalls als antimikrobielle Substanz verwendet, was bei den Wuchstests auf Festmedium auch deutlich zu sehen war. Jeder untersuchte Stamm wies einen großen Hemmhof um das Filterplättchen mit aufgetropftem Kupferchlorid auf. (Paladini *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012) Die Supplementierung über die Filter auf das Festmedium stellte demnach keine Einschränkung für die Überprüfung dar. Pandian *et al.* zeigten 2010, dass der Effekt von Silber auf *B. subtilis* dosisabhängig ist. Bei 1 mM Silbernitrat wurde das Silber in für die Zelle ungefährliche Nanopartikel umgewandelt, während 5 mM Silbernitrat zur Apoptose der Zelle führten. (Pandian *et al.*, 2010) Auf jedes Filterplättchen wurden im Versuch 5 µl einer 100 mM Lösung getropft. Dies hätte mehr als genug sein sollen, um einen Hemmhof ähnlich dem des Kupfer- bzw. Nickelchlorids auszulösen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass gleich mehrere sRNAs an der Regulation einer Silber-spezifischen Stressreaktion beteiligt sein könnten. Wenn dieser Phänotyp weiter verfolgt werden soll, sollten zunächst Studien zur Dosisabhängigkeit der Reaktion durchgeführt werden.

4.3.2 Nährstofflösungen

Das Wachstum der Überexpressionen von scr2736, scr6925 und scr2952 sowie des Referenzstamms mit Leerplasmid wurden unter Supplementierung von Glucose, Glucose-6-Phosphat, Fructose, Fructose-6-Phosphat, Glycerin, N-Acetylglucosamin, Galactose, Citrat und MEM-Casaminosäuren (50x Aminosäure-Stocklösung) überprüft. Als einzige sRNA zeigte die Überexpression von scr2952 einen Effekt bei der Zugabe verschiedener Metabolite, während die übrigen getesteten Überexpressionsstämme keinen spezifischen Wuchseffekt zeigten (Abb. 3.38).

Die Überexpression von scr2952 zeigte eine sehr distinkte Reaktion auf die Supplementierung mit Citrat. Der Citrat-Zyklus ist ein zentrales Bindeglied zwischen der Glykolyse und weiteren Stoffwechselwegen. Er ist zudem essentiell für die Reduzierung des Säuremilieus in der Zelle und es wird vermutet, dass er als Kontrollpunkt für Entwicklungsstadien dient. (Viollier *et al.*, 2001a; Viollier *et al.*, 2001b) Citrat an sich ist ein Primärmetabolit und wird von einer Vielzahl an Organismen als Kohlenstoff-, Energie- und Eisenionen-Quelle genutzt, da es vornehmlich komplexiert mit Eisenionen aufgenommen wird. (Lensbouer *et al.*, 2008)

Die aufgetropfte Citratlösung induzierte bei der Überexpression von scr2952 einen starken, ringförmigen Wuchs um das Filterplättchen herum (Abb. 3.38). Interessanterweise zeigte dieser Stamm auch bei der Überprüfung der Metalllösungen unter Eisensulfat und Eisenchlorid ein verstärktes Wachstum. Bei der Zugabe von Ammoniumeisencitrat war das Wachstum noch etwas stärker (Abb. 3.31). Dieses Verhalten korrespondiert damit, dass in *S. coelicolor* Citrat im Komplex mit Eisen von der Zelle aufgenommen wird. Auch eine spezifische Reaktion auf Eisenstress wäre denkbar.

Die Überexpressions- und Deletionsmutante von scr2952 zeigten einen genau entgegengesetzten Phänotyp. Während das Wachstum der Überexpression von Citrat angeregt wurde, wurde das

Wachstum der Deletionsmutante gehemmt. Der starke Wuchseffekt konnte nur bei Nährstofflösungen beobachtet werden, die einen niedrigen pH-Wert (pH 1-2) hatten. Bei Lösungen eines physiologischen pH-Wertes (pH 6-7) zeigte sich keine Reaktion. Dieses Verhalten wurde sowohl bei Citrat, als auch Pyruvat beobachtet. Die Metabolite Malat und Oxalacetat konnten bei keinem pH-Wert das Wuchsverhalten beeinflussen. In *E. coli*, *Rhizobium leguminosarum* und *Corynebacterium glutamicum* konnten Transportsysteme zur Aufnahme von Pyruvat in die Zelle ermittelt werden. (Gimenez *et al.*, 2003; Hosie *et al.*, 2002; Jolkver *et al.*, 2009) Abgesehen davon ist das Wissen über Mechanismen der Pyruvataufnahme sehr begrenzt. Auch in *S. coelicolor* ist der Mechanismus ungeklärt. Des Weiteren ist unklar, ob der Transport durch Eisen vermittelt bzw. in Komplex mit dem Metall abläuft. Eine Sigmafaktor-vermittelte Regulation aufgrund von pH-Stress könnte den Effekt auslösen. Weitere pH-Wert bezogene Untersuchungen sind daher für die Eingrenzung des Effektes nötig.

4.4 Analyse der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

Der ungewöhnliche Phänotyp der Deletionsmutanten von scr4632 und scr6925 und deren Produktion von goldfarbener Flüssigkeit war der auffälligste Effekt dieser Studie (Kapitel 3.7).

4.4.1 Sekretion einer goldenen Flüssigkeit

Die Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) wurden auf verschiedenen Medien mit unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzungen angezogen, um den Auslöser des Phänotyps zu untersuchen. Es konnte ermittelt werden, dass die Produktion der goldfarbenen Substanz nur auf Soja-haltigem Medium auftrat (Abb. 3.55 und 3.57-59). Da die Sojakomponente des Mediums aus Sojamehl der ganzen Sojabohne gewonnen wird, ist die Liste an Inhaltsstoffen sehr lang (Anhang, Tab. 6.5). Aminosäuren wurden als definierte, singuläre Medienzusätze ausgewählt und das Wachstum der Deletionsstämme darauf getestet. Keine der einzelnen Aminosäuren konnte die Produktion des goldenen Sekrets induzieren (Tab. 3.12; Anhang, Abb. 6.14-6.19). Es wäre möglich, dass zwei oder mehrere Aminosäuren gemeinsam für den goldenen Phänotyp verantwortlich sind. Auch andere Komponenten von Soja wie Fettsäuren oder Vitamine könnten alleine oder in Kombination hierfür ursächlich sein. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

Die Anzucht der Zellen auf Festmedium mit aufgelegter Folie hatte zusätzlichen Einfluss auf die Produktion des goldenen Sekrets. Wurden die Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 auf Festmedium ohne Folie angezogen, sekretierten sie große Mengen der goldenen Substanz. Wurden die Zellen auf einer, dem Medium aufliegenden, Folie angezogen, wurde keine goldfarbene Flüssigkeit produziert (Abb. 3.56). Die aufgelegte Folie verhindert das Eindringen der vegetativen Hyphen in das Substrat und dient der erleichterten Ernte der Zellen vom Festmedium. Es ist möglich, dass die Induktoren der Flüssigkeitsproduktion nicht durch die aufgelegte Folie diffundieren können. Auch eine Verbindung der morphologischen Differenzierung mit der Produktion des Sekrets ist denkbar. So könnte z.B. das Signal zur Produktion der goldenen Substanz durch die fehlende Maturierung der vegetativen Hyphen ausbleiben.

In einer Proteomanalyse wurde das Gesamtprotein der Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 untersucht. Hierbei tauchten bei beiden Deletionsstämmen distinkte

Banden auf, wenn die Zellen auf Folie angezogen worden waren (Abb. 3.64 α - δ). Eine massenspektrometrische Untersuchung ergab für die Proteinbanden aus beiden Stämmen das Protein BldKB (Tab. 3.14, Anhang 6.3.6). Das Gen SCO5113 in *S. coelicolor* kodiert das ABC Transporter Lipoprotein BldKB. Es ist beteiligt an der Differenzierung des Myzels durch Regulation des Oligopeptids Bld261, welches den ersten Schritt des Differenzierungsprozesses einleitet. (Chavez *et al.*, 2011; Nodwell & Losick, 1998) Die Zellen waren auf Folie angezogen worden, weshalb das identifizierte Protein besser zu den Wachstumsbedingungen auf Folie und der Beeinflussung des Wachstums des vegetativen Myzels passt als zum Phänotyp der Sekretion goldener Flüssigkeit. Es handelt sich nicht um einen unspezifischen Effekt des Wachstums auf Folie, da keiner der anderen überprüften Stämme einen ähnlichen Effekt zeigte.

Da die aufgelegte Folie auf Festmedium offensichtlich sowohl die Produktion des goldenen Sekrets (Abb. 3.56) als auch die Differenzierung des vegetativen Myzeliums (hochreguliertes BldKB) beeinflusst, kann vermutet werden, dass die sRNAs scr4632 und scr6925 in die Regulation beider Prozesse eingreifen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Expressionsanalyse der Überexpressionsstämme von scr4632 und scr6925. Hier konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der jeweils einen sRNA die Expression der zweiten sRNA induziert (Abb. 3.68).

4.4.2 Gegenseitige Beeinflussung von scr4632 und scr6925

4.4.2.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay

In der Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass in den Überexpressionsstämmen von scr4632 und scr6925 die Expression einer sRNA die Expression der jeweils anderen ebenfalls beeinflusste (Abb. 3.68). Es sind bislang jedoch keine sRNAs bekannt, die eine andere sRNA direkt regulieren. Vielmehr können sie deren Interaktionspartner, wie z. B. Proteine, abfangen. In *E. coli* wird die sRNA GlmZ vor der Degradation geschützt, indem die sRNA GlmY das RNase-Adapterprotein RapZ abfängt. (Göpel *et al.*, 2014) Eine direkte Interaktion der sRNAs tritt bei diesem Regulationsmechanismus ebenfalls nicht auf.

Durch ein Gelverzögerungsexperiment wurde untersucht, ob die Transkripte von scr4632 und scr6925 miteinander interagieren können. Bei der Inkubation des Transkriptes der radioaktiv markierten sRNA scr6925^{32P} mit dem Transkript von scr4632 zeigte sich eine größere Bande im Polyacrylamidgel, die einen Komplex der beiden Transkripte darstellen könnte (Abb. 3.72 Pfeil).

Antisense RNAs sind in der Lage, durch Paarung an die naszierende mRNA die Transkription abubrechen. (Waters & Storz, 2009) Für sRNAs konnte bislang kein vergleichbarer Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene gefunden werden. Dennoch ist es möglich, dass sie auch hier regulatorische Funktionen ausführen, die bisher nicht entdeckt wurden. Für asRNAs wurden diese Mechanismen auch erst spät in der Erforschung nicht-kodierender, regulatorischer RNAs identifiziert. Das frei verfügbare Programm IntaRNA dient der Vorhersage von Interaktionen zweier RNA-Moleküle, wie z. B. einer sRNA mit ihrer potentiellen Ziel-mRNA. [H3; (Busch *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2014)] Mit diesem Programm wurde in der Promotorregion von scr6925 eine 10 bp lange, potentielle Bindestelle von scr4632 vorhergesagt (Abb. 4.8 A). Da die Organisation von Promotoren in *S. coelicolor* bislang nur unzureichend aufgeklärt ist, wurden als Promotorregion 100 bp *upstream* der sRNA-Sequenz untersucht. Die für eine sRNA-Bindung typische *loop*-Region der zweiten Stammschleife von scr4632 wurde als Bindemotiv vorhergesagt (Abb. 4.8 B). Dieses liegt in der Nähe der Transkriptionsinitiations-Region, welche durch die

Bindung der sRNA blockiert werden könnte (Abb. 4.8 C). sRNAs sind jedoch nicht in der Lage, die DNA aufzuwinden, um einzelsträngige Bereiche der DNA für eine Interaktion freizulegen. Die Bindung von scr4632 in der Promotorregion von scr6925 könnte daher nur erfolgen, wenn die sRNA gerade transkribiert und die DNA deshalb aufgewunden ist. Die Involvierung eines Proteins, welches die Bindung der Sequenzen vermittelt, könnte die Regulation ebenfalls ermöglichen. Bisher ist in Streptomyceten kein Protein dieser Funktion bekannt.

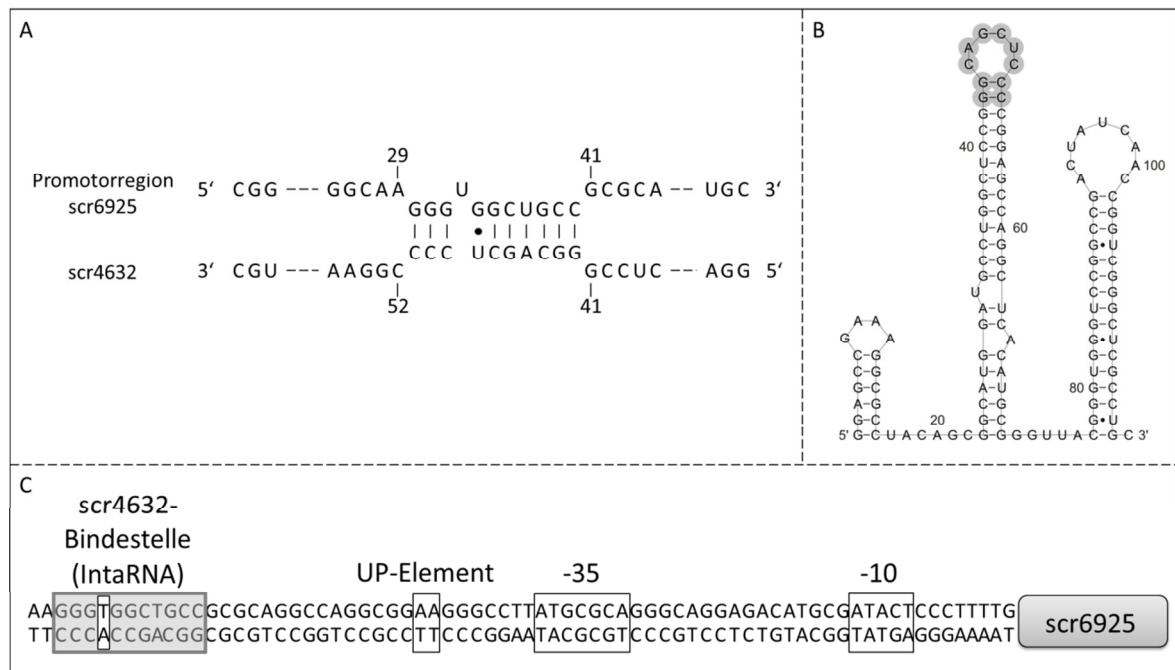


Abbildung 4.8: Vorhersage der Bindestelle von scr4632 in der Promotorregion von scr6925

A Durch das Programm IntaRNA vorhergesagte Interaktion der Promotorregion von scr6925 mit der sRNA scr4632. **B** Lage des vorhergesagten Bindemotivs der sRNA scr4632 bei der Interaktion mit der Promotorregion von scr6925 in der Sekundärstruktur. **C** Ausschnitt der genomischen DNA von *S. coelicolor*. Lokalisation der potentiellen Bindestelle in der Promotorregion von scr6925.

In Prokaryoten ist bislang noch kein Mechanismus bekannt, bei dem eine regulatorische nicht-kodierende RNA die Transkription beeinflusst. In Eukaryoten konnte eine solche Regulation mittlerweile nachgewiesen werden. Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi), bei dem regulatorische RNAs mit Hilfe von Proteinen (Argonaute) oder Proteinkomplexen RISC (RNA-induced silencing complex) zum Abbau von mRNA führen, ist bereits länger bekannt. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass *small interfering* RNAs (siRNAs) auch an einem transkriptionellen Gen-silencing (TGS) beteiligt sind. Dies wurde zunächst in Pflanzen beobachtet und später auch in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* sowie in *Drosophila* nachgewiesen. (Mette *et al.*, 2000) Morris *et al.* konnten 2004 zeigen, dass siRNAs auch in humanen Zellen die Promotoraktivität direkt beeinflussen können. (Morris *et al.*, 2004) siRNAs reprimieren die Transkription durch RNA-vermittelte DNA-Methylierung oder direkte Beeinträchtigung der Transkriptionsinitiation. (Moazed, 2009; Napoli *et al.*, 2009) Bislang ist in Streptomyceten (und Prokaryoten) kein ähnlicher Prozess transkriptioneller Genregulation bekannt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein solcher Regulationsmechanismus auch in Prokaryoten existiert.

4.4.2.2 Quantitative *Real-Time*-PCR des Deletionsstamms von scr6925 (6delP)

Durch die Insertion des Deletionsplasmids pCK_6del ins Genom waren die Sequenzen der beiden, die sRNA flankierenden, Gene verdoppelt worden. Deshalb wurden die Transkriptmengen der Genprodukte von SCO6924 und SCO6925 in einer quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) überprüft. Im Deletionsplasmid pCK_4del waren nur Fragmente der benachbarten Gene von scr4632 enthalten, weshalb die Transkriptmengen der benachbarten Gene von scr4632 (SCO4631 und SCO4632) nicht überprüft wurden.

Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass das Genprodukt von SCO6924, einem hypothetischen DNA-Bindeprotein, im Vergleich zum Wildtyp 3fach hochreguliert war. Das als Membranprotein vorhergesagte Genprodukt von SCO6925 wurde ca. 15fach hochreguliert exprimiert (Abb. 3.71). Es stellt sich die Frage, weshalb die mRNA 15fach hochreguliert wird, wenn das Gen nur verdoppelt wurde. Eine erhöhte Expression oder ein verzögerter Abbau des Transkripts könnten dafür verantwortlich sein. Eine nicht mit der *upstream*- bzw. *downstream*-Region inserierte Regulatorbindestelle könnte ebenfalls Auslöser für die Erhöhung des Transkriptes sein.

Die hohe Expression könnte ursächlich für den von 6delP gebildeten Phänotyp gewesen sein, zumal die 15fach höher transkribierte mRNA das vorhergesagte Membranprotein kodiert. Das erklärt allerdings nicht die Tatsache, dass der gleiche Phänotyp auch im Deletionsstamm von scr4632 auftrat (Abb. 4.9 A). Die Überexpressionen der sRNAs induzierten keinen Phänotyp (Abb. 4.9 B).



Abbildung 4.9: Phänotypen der Überexpressions- und Deletionsstämme von scr4632 und scr6925

A Im Deletionsstamm von scr6925 (6delP) waren die umliegenden Gene durch Insertion des Deletionsplasmids pCK_6del verdoppelt. SCO6924 wurde 3fach höher als in der Referenz exprimiert, SCO6925 sogar 15fach höher. Beide Deletionsstämme zeigten einen ausgeprägten, goldenen Phänotyp. **B** Die Überexpressionsstämme zeigten eine starke Expression der sRNA-Transkripte, aber keinen goldenen Phänotyp.

Trotz zweijähriger, stetiger Vereinzelung der Deletionsstämme mit *single crossover* war es nicht möglich, einen *double crossover* und somit eine Deletion der sRNA-Sequenzen zu erreichen. Dies

legt die Vermutung nahe, dass die Sequenzen möglicherweise essentiell sind. Ungewöhnlich wäre in diesem Fall, dass gleich zwei sRNA-Sequenzen essentiell sein sollten. Dies kann zum jetzigen Zeitpunkt aber nicht ausgeschlossen werden.

Für eine Überprüfung, ob die sRNAs essentiell sind, könnten die sRNA-Sequenzen in ein temperatursensitives Plasmid inseriert werden. Dieses Plasmid wird in die Deletionsstämme konjugiert und sorgt für die Expression des Transkripts, auch wenn ein *double crossover* stattfindet und die genomische sRNA-Sequenz deletiert wird. Nach einem *double crossover* wird das Plasmid durch Hitzeeinwirkung zerstört und die Zellen sollten absterben, wenn die sRNAs tatsächlich essentiell sind. Diese Experimente stehen noch aus.

4.5 Fazit und Ausblick

In *S. coelicolor* konnten in früheren Arbeiten sRNA-Sequenzen nicht nur vorhergesagt und verifiziert werden, sondern auch Ziel-mRNAs wie die Agarase *dagA* oder die Methionin-Synthase *metE* determiniert werden. Für diesen Organismus konnte somit die Regulation über sRNAs bereits nachgewiesen werden. Die Aufklärung der Funktion weiterer, bereits vorhergesagter sRNAs ist von großem wissenschaftlichem Interesse.

Die Untersuchung von sRNAs gestaltet sich in einem so komplexen Organismus wie *S. coelicolor* schwierig. Das Bakterium durchläuft eine Abfolge komplizierter morphologischer Differenzierungsschritte und muss die Vielzahl der produzierten Sekundärmetabolite zusätzlich koordinieren. Jede dieser Regulationsebenen muss in einzelnen Versuchen angesprochen werden, um den Regulationsort einer sRNA zu identifizieren. Dies gilt zumindest, wenn keine definierten Expressions- oder Wuchsänderungen aufgrund der Manipulation der Transkriptmenge in Überexpressions- und Deletionsmutanten, auftreten.

In dieser Studie wurde versucht, für sieben sRNA-Kandidaten eine Funktion bzw. eine Ziel-mRNA zu determinieren. Die durchgeführten Studien zu Expression, Wuchsform und Stressreaktion erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Die sRNA scr2952 scheint an der Umsetzung von Citrat oder an der Reaktion auf pH-Wert induzierten Stress beteiligt zu sein. Beide Möglichkeiten müssen näher untersucht werden.

Der prägnante goldfarbene Phänotyp von sRNAs scr4632 und scr6925 entstand durch Integration der Deletionsplasmide in das Genom (*single crossover*). Der Genotyp der Mutanten konnte geklärt werden, lieferte aber keine Erklärung für den Phänotyp. Die Zusammensetzung der sekretierten Flüssigkeit und die Ursache seiner Produktion muss in Zukunft weiter untersucht werden. Besonders interessant ist dabei die Beobachtung, dass hier die Möglichkeit besteht, einen Regulationsmechanismus aufzudecken, an dem zwei sRNAs gleichzeitig beteiligt sind.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Tabelle 5.1: Geräteverzeichnis

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav	Getinge, Schweden
Autoklaviertopf	Sitram, Frankreich
Bioflow D-220-2	Bioflow Technik GmbH, Meckenheim
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank (28°C, 37°C)	Heraeus Christ, Osterode
Bunsenbrenner	Usbeck KG, Radevormwald
ChemiDoc™ MP Imaging System	Biorad, München
Dispenser, Multipette	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine AF-10	Scotsman Ice Systems, USA
Elektrophoresekammern	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg
	Roth, Karlsruhe
	C.B.S. Scientific, USA
	peqLab, Erlangen
Electrophoresis Power Supply Consort	peqLab, Erlangen
Electroporator Micropulser	Biorad, München
FastPrep®-24	MP Biomedicals, USA
Feinwaage	Acculab, USA
Fujifilm FLA-5000	Fujifilm Life Science, Düsseldorf
Gelschüttler GFL	Karow, Berlin
Heizblock	VWR, Darmstadt
Heizrührer MR Hei-Mix L	Heidolph, Kelheim
Hybridisierungssofen HC 300c Hybricycler	UVP Laboratory Product, USA
Image Eraser, Image Eraser SF	Molecular Dynamics, USA
Inkubationsschüttler Aquatron	Infors AG, Bottmingen
Inkubationsschüttler Minitron	Infors AG, Bottmingen
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
Kochplatte	Rommelsbacher GmbH, Dinkelsbühl
Kulturschüttler Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank (Premium/Comfort)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Labnet Revolver™ Adjustable Rotator	Labnet International, Inc., USA
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Mikroskop Axiostar <i>plus</i>	Zeiss, Jena
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main
Mini-Protean® Tetra Cell	Biorad, München
Multifuge 1L-R	Heraeus Christ, Osterode
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqLab, Erlangen
Olympus BH-2 mit Fototubus	Olympus, Hamburg
Olympus Coolpix P7700	Olympus, Hamburg
peqSTAR	peqLab, Erlangen
pH Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald

Pipettierhilfe Pipetman	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Protean® II xi Cell	Biorad, München
Raytest Eraser	raytest, Straubenhardt
Safire 2	Tecan Trading AG, Schweiz
Sechsfach Filtrationssystem AS 600/5	Roth, Karlsruhe
Spannungsnetzgerät	Biorad, München
Spektrometer	GE Healthcare, Freiburg
Stereomikroskop BMS 143 Trino Zoom	Breukhoven, Niederlande
Tankblotter	peqLab, Erlangen
Thermocycler peqStar 96 universal gradient	peqLab, Erlangen
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühltruhe Premium nofrost (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Tiefkühltruhe (-80°C)	Heraeus Christ, Osterode
Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, USA
Trockenschrank	Heraeus Christ, Osterode
Typhoon 9400 Variable Mode Imager	GE Healthcare, Freiburg
UV-Crosslinker	Vilber, Eberhardzell
UV Schirm 254 mm	INTAS, Göttingen
UV Schirm 312 mm	INTAS, Göttingen
Videodokumentationsanlage	INTAS, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage Atilon	Acculb, USA
Wallac 1409 liquid scintillation counter	Wallac, Monza
Wasserbad E	Julabo, Seelfeld
Wasserbad ED	Julabo, Seelfeld
Wasserkocher, Discovery Duo	Kenwood, Japan
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Frankreich
Wärmeschrank	EHRET, Emmendingen

Tabelle 5.2: Hilfsmittel- und Verbrauchsgüterverzeichnis

Material	Bezugsquelle
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München
Becherglas, Glas	Schott Duran, Jena
Becherglas, Kunststoff	Vitlab, Großostheim
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dispenserspritze 20 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Dispenserspritze 50 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmachfolie 1-2-3	Deti, Meckesheim
Einmalhandschuhe Nitril-Light	VWR, Leuven, Belgien
Einmalhandschuhe Nitril Xceed®	Starlab, Hamburg
Einmalpipette (5; 10; 25 ml)	nerbe plus, Winsen
Einmalspritze (10; 20 ml)	Braun, Melsungen
Filterpapier	Whatman, England
Filterplättchen (Ø 5 mm)	Roth, Karlsruhe
Gasperlen (0,5; 5 mm)	Roth, Karlsruhe
Glaspipette (5; 10; 25 ml)	Ochs, Bovenden
Glasplatten (10; 20 cm)	C.B.S. Scientific, USA

Haftsichtfolie Sarogold Pro	Roth, Karlsruhe
Kanülen, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Küvette, Acryl	Sarstedt, Nümbrecht
Küvette, Elektroporation (25x2 mm Gap)	peqLab, Erlangen
Messzylinder	Vitlab, Großostheim
MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp®Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikropipette (2; 20; 200; 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Mikropipettenspitzen (10 µl)	Gilson, Frankreich
Mikropipettenspitzen (200; 1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Mikropipettenspitzen mit Filter (10; 20; 200; 1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Mikropipettenspitzen mit Filter (10; 20; 200; 1000 µl)	nerbe plus, Winsen
Mikrotiterplatte (60)	Greiner, Nürtingen
Nylonmembran Hybond-N+	GE Healthcare, München
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipette	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäß mit flachem Deckel (0,2 ml)	peqLab, Erlangen
PCR-Reaktionsgefäß mit gewölbtem Deckel (0,2 ml)	peqLab, Erlangen
Pesu Membrane 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Petrischale, Kunststoff	Sarstedt, Nümbrecht
Storage Phosphor Screen (20x25; 20x40 cm)	GE Healthcare, München
Plexiglasplatten für Agarosegele	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg
Reagenzgläser	Schott Duran, Jena
Reaktionsgefäß (1,5; 2 ml)	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäß (15; 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Schikanekolben (250; 2000 ml)	Schott Duran, Jena
Schraubflaschen, Glas (100; 250; 500; 1000; 2000 ml)	Simax, Prag
Sephadex Illustra MicroSpin G-25 Columns	GE Healthcare, München
Skalpellklinge	Aesculap AG, Tuttlingen
Spannungsnetzteil	Bio-Rad, USA
Sterilfilter Filtropur (S0,2; S0,45)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Stericup (250; 500; 1000 ml)	Millipore, Frankreich

Tabelle 5.3: Verzeichnis kommerziell erhältlicher Systeme

System	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Antifoam B Emulsion	Zur Vermeidung von Schaumbildung in Kulturen	Sigma, München
Bradford Reagenz (5x)	Bestimmung von Proteinkonzentration	Biorad, München
CloneJET PCR Cloning Kit	Zwischeninsertion von PCR-Fragmenten	ThermoFisher, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6x)	Auftragen von DNA auf Agarosegele (Erhöhung von Dichte, Färbung)	peqLab, Erlangen
Maxtract High Density Tube 2 ml	Auftrennen von Nukleinsäuren und Proteinen	QIAGEN, Hilden
Mini-Protean® TGX™ Precast Gels, Anykd	Auftrennung von Proteinen	Biorad, München
SYBR® Green PCR Master Mix	Master Mix zur Durchführung der qRT-PCR	ThermoFisher, Darmstadt
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Minipräparation von Plasmid-DNA	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Maxipräparation von Plasmid-DNA	QIAGEN, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	QIAGEN, Hilden

5.2 Chemikalien

Tabelle 5.4: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Propanol (Isopropanol)	ProLab VWR, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propanolsulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure (X-Gluc)	X-Gluc Direct, UK
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetyl-CoA	Sigma Aldrich, USA
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung; Rotiphorese® Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	peqLab, Erlangen
(L) Alanin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(II)citrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Apramycin	Sigma Aldrich, USA
(L) Arginin	Roth, Karlsruhe
(L) Asparagin	Roth, Karlsruhe
(L) Asparaginsäure	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Baumwollblau (auch Cotton blue)	Sigma Aldrich, USA
Betain	Sigma Aldrich, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Brilliant Blue G 250	Sigma Aldrich, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Bovine serum albumin (Rinder-Serum-Albumin, BSA)	New England Biolabs, USA
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Casaminosäuren (CAA)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
Cycloheximid	Roth, Karlsruhe
(L) Cystein	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, USA
DMSO, 100% gelöst	Finnzymes, Finnland
dNTPs (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), 100 mM	peqLab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Eisen(III)Chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe

Eisen(II)Sulfat-Heptyhydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
Formamid, deionisiert	Roth, Karlsruhe
(D+) Fructose 1,6-Bisphosphat	Sigma Aldrich, USA
Gelrite®	Roth, Karlsruhe
(D+) Glucose	Roth, Karlsruhe
(D+) Glucose 6-Phosphate	Sigma Aldrich, USA
(L) Glutamin	Roth, Karlsruhe
(L) Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
(L) Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
(L) Histidin	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
(L) Isoleucin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)Chlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
(L) Leucin	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
(L) Lysin	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
(DL) Malat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)Chlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Mannitol	Roth, Karlsruhe
MEM Amino Acids (50x) solution	Sigma Aldrich, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
(L) Methionin	Roth, Karlsruhe
Milchsäure	Sigma Aldrich, USA
Nalidixinsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
4-Nitrophenyl β-D-Glucuronid (PNG)	Sigma Aldrich, USA
Oxalacetat	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI - 25:24:1, PH 7,5-8)	Roth, Karlsruhe

p-Nitrophenyl-β-D-glucoronide (PNG)	glycosynth, UK
Phenol (Roti®Aqua Phenol, pH 4,5-5)	Roth, Karlsruhe
(L) Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
Phosphoenolpyruvat	Sigma Aldrich, USA
Phosphomycin	Sigma Aldrich, USA
Polyethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Prähybridisierungslösung (Roti Hybri Quick)	Roth, Karlsruhe
Prähybridisierungslösung Rapid-hyb Buffer	GE Healthcare, München
(L) Prolin	Roth, Karlsruhe
Pyruvat	Sigma Aldrich, USA
Rotiszinti® eco plus	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
(L) Serin	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Soja, fettarm	Hensel (Reformhaus)
Streptomycin	Sigma Aldrich, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thiostrepton	Sigma Aldrich, USA
(L) Threonin	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tryptic Soy Broth (TSB)	Becton Dickenson, USA
Trypton	Oxoid, Heidelberg
(L) Tryptophan	Roth, Karlsruhe
(L) Tyrosin	Roth, Karlsruhe
(L) Valin	Roth, Karlsruhe
Wasser, autoklaviert, DEPC-behandelt (RNase- und DNase- frei)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe

5.3 Medien

Tabelle 5.5: Streptomyceten-spezifische Medien

Medium	Zusammensetzung	Menge
Evans-Basismedium 2x	0,1 M CaCl ₂	5 ml
	1 M MOPS	200 ml
	1 M KCl	20 ml
	1 M Na ₂ SO ₄	4 ml
	1 M C ₆ H ₈ O ₇	5 ml
	1 M MgCl ₂	2,5 ml
	10 mM NaMoO ₄	200 µl
	Spurenelemente	10 ml
	pH 7,2 (NaOH)	
	MQ	ad 1 l
	autoklavieren	

Material und Methoden

Evans-Balanced	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	2,5 ml
	2 M NaNO ₃	2,5 ml
	2 M NaH ₂ PO ₄	50 µl
	MQ	ad 50 ml
Evans-C-limitiert	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	250 µl
	2 M NaNO ₃	2,5 ml
	2 M NaH ₂ PO ₄	50 µl
	MQ	ad 50 ml
Evans-N-limitiert	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	2,5 ml
	2 M NaNO ₃	250 µl
	2 M NaH ₂ PO ₄	50 µl
	MQ	ad 50 ml
Evans-P-limitiert	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	2,5 ml
	2 M NaNO ₃	2,5 ml
	2 M NaH ₂ PO ₄	10 µl
	MQ	ad 50 ml
Evans mit x% Zusatz	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	2,5 ml
	2 M NaNO ₃	2,5 ml
	2 M NaH ₂ PO ₄	50 µl
	x% Zusatz [EK]	x ml
	MQ	ad 50 ml
Evans mit x mM Zusatz	Evans-Basismedium 2x	25 ml
	50% Glucose	2,5 ml
	2 M NaH ₂ PO ₄	50 µl
	x mM Zusatz [EK]	x ml
	MQ	ad 50 ml
GYM	Glucose	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	Malzextrakt	10 g
	CaCO ₃	2 g
	Agar	20 g
	MQ	ad 1l
	pH 7,2	
	autoklavieren	
	Flüssigmedium ohne CaCO ₃	
Minimalmedium	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01 g
	Agar	20 g
	pH 7-7,2 (HCl)	
	MQ	ad 900 ml
	autoklavieren	

Material und Methoden

	+10% C-Quelle	ad 1l
R2YE	Saccharose	103 g
	K ₂ SO ₄	0,25 g
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	10,12 g
	Glucose	10 g
	Casaminosäuren	0,1 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar	20 g
	MQ	ad 800ml
	autoklavieren	
Lösungen einzeln herstellen und autoklavieren. Mastermix herstellen und dem Medium vorgewärmt zugeben.	5,73% MOPS	100 ml
	0,5% KH ₂ PO ₄	10 ml
	3,68% CaCl ₂ * 2 H ₂ O	80 ml
	20% L-Prolin	15 ml
	Spurenelemente	2 ml
SM-Medium	Soja (fettarm)	2% (w/v)
	Mannitol	2% (w/v)
	Agar	2% (w/v)
	autoklavieren	
Spurenelemente	ZnCl ₂	40 mg
	FeCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg
	MQ	ad 100 ml
	autoklavieren	
TSB-Medium	TSB	3% (w/v)
	autoklavieren	

Tabelle 5.6: *E. coli*-spezifische Medien

Medium	Zusammensetzung	Menge
KHPO₄-Puffer	1 M K ₂ HPO ₄	203,5 ml
	1 M KH ₂ PO ₄	46,5 ml
	autoklavieren	
LB-Medium	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
TB-Medium	Trypton	1,2% (w/v)
	Hefeextrakt	2,4% (w/v)
	Glycerin	0,4% (w/v)
	MQ	ad 900 ml
	autoklavieren	
	Nach dem Autoklavieren 100 ml KHPO ₄ -Puffer pH 7,5 zufügen.	
SOC-Medium	Trypton	2% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	10 mM

	KCl	0,25 mM
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mM
	MgCl ₂ * 7 H ₂ O	10 mM
	autoklavieren	
Weichagar	Fleischextrakt	0,3% (w/v)
	Pepton	0,5% (w/v)
	Agar	0,5% (w/v)
	MQ	ad 150 ml
	autoklavieren	

5.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 5.7: Verwendete Puffer- DNA

Puffer	Zusammensetzung	Menge
4x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	Xylencyanol	0,1% (w/v)
	Glycerin	50% (v/v)
	50% TAE	2% (v/v)
50x TAE-Puffer	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	50 mM
	pH 8,3	
	autoklavieren	

Tabelle 5.8: Verwendete Puffer- RNA

Puffer	Zusammensetzung	Menge
RNA-Extraktionspuffer	Natriumacetat	10 mM
	Saccharose	150 mM
	pH 4,8 (Essigsäure)	
	sterilfiltrieren	
2x RNA-Ladepuffer (denaturierend)	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,01% (w/v)
	Xylencyanol	0,01% (w/v)
	in Formamid (deionisierend)	
5x RNA-Ladepuffer (nativ)	Glycerin	50%
	Bromphenolblau	0,20%
	10x TB	0,5x
20x SSC	Natriumcitrat	0,3 M
	NaCl	3 M
	pH 7 (HCl)	
	autoklavieren	
10x Strukturpuffer	Tris-Cl, pH 7	100 mM
	KCl	1 M
	MgCl ₂	100 mM
	sterilfiltrieren, -20°C	
10x TB	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	autoklavieren	

10x TBE-Puffer	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	10 mM
	pH 8,3	
	autoklavieren	

Tabelle 5.9: Verwendete Puffer- Protein

Puffer	Zusammensetzung	Menge
10x Anodenpuffer	Tris	1 M
	pH 8,9 (HCl)	
	autoklavieren	
3x Gelpuffer	Tris	3 M
	20% SDS	0,3%
	pH 8,45 (HCl)	
	autoklavieren	
10x Kathodenpuffer	Tris	1 M
	Tricin	1 M
	20% SDS	1%
	pH 8,25 (HCl)	
	autoklavieren	
5x Laemmli Laufpuffer	Tris	125 mM
	Glycerin	1,25 M
	20% SDS	0,5%
	autoklavieren	
4x PAB Ladepuffer	β-Mercaptoethanol	1,5 ml
	20% SDS	2 ml
	Bromphenolblau	150 mg
	Glycerin	5 ml
	pH 4,8 (Essigsäure)	
10x ZAP	NaCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8 [1 M]	500 mM
	autoklavieren	
1x ZAP	10x ZAP	10 ml
	Glycerin	10 ml
	MQ	ad 100 ml
	vor Verwendung frisch ansetzen	
Colloidal Coomassie Färbelösung	(NH ₄) ₂ SO ₄	80 g
	H ₃ PO ₄	9,6 ml
	Brilliant Blue G-250	1 g
	Methanol	200 ml
	autoklavieren	
	ÜN färben, entfärben mit MQ	
Fixierer Coomassie Colloidal	Essigsäure	10%
	Ethanol	40%
	ÜN fixieren	
Gus-Puffer	NaH ₂ PO ₄	3 g
	Na ₂ HPO ₄	4,1 g
	Triton X-100	1 g

	MQ	ad 1 l
	pH 7	
Gus1-Puffer	Gus-Puffer	100 ml
	DTT, 1 M	500 µl
	kurz vor Verwendung frisch ansetzen	

Tabelle 5.10: Lösungen zur Silberfärbung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge pro Gel
Fixierungslösung	Methanol	250 ml
	Essigsäure	60 ml
	Formaldehyd, frisch zusetzen	250 µl
	MQ	ad 500 ml
Lösung 1	Natriumthiosulfat	0,1 g
	MQ	ad 500 ml
Lösung 2	Silbernitrat	0,5 g
	Formaldehyd, frisch zusetzen	187,5 µl
	MQ	ad 250 ml
Lösung 3	Natriumcarbonat	15 g
	Formaldehyd, frisch zusetzen	125 µl
	Lösung 1	5 ml
	MQ	ad 250 ml
Wasch-Ethanol	Ethanol	50% (v/v)
	MQ	ad 1000 ml
Stopplösung	Essigsäure, konzentriert	100 ml

5.5 Enzyme

Tabelle 5.11: Verwendete Enzyme und Marker

Enzym	Bezugsquelle
Polymerasen [5 U/µl]	
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, USA
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	Invitrogen, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs, USA
T7-Polymerase	Dr. Karl von Laer, Goethe-Universität, Frankfurt a.M.
Restriktionsendonukleasen [20 U/µl]	
BamHI-HF	New England Biolabs, USA
Clal	New England Biolabs, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, USA
HindIII-HF	New England Biolabs, USA
NotI	New England Biolabs, USA
PstI-HF	New England Biolabs, USA
XbaI	New England Biolabs, USA
Sonstige Enzyme	
Antarktische Phosphatase [100 U/µl]	New England Biolabs, USA
Calf-Intestine Phosphatase (CIP) [1 U/µl]	Roche Diagnostics, Schweiz
Polynukleotid-Kinase [100 U/µl]	Roche Diagnostics, Schweiz

RiboLock RNase Inhibitor [40 U/μl]	Invitrogen, Darmstadt
T4 DNA Ligase [100 U/μl]	New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotid-Kinase [100 U/μl]	New England Biolabs, USA
Turbo DNase [2 U/μl]	Ambion, USA
Marker	
peqGold Ultra Low Range Leiter II	peqlab, Erlangen
peqGold 1 kb DNA-Leiter	peqlab, Erlangen
Low Range ssRNA Ladder	New England Biolabs, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard	Biorad, München

5.6 Antibiotika

Tabelle 5.12: Verwendete Antibiotika- *S. coelicolor*

Antibiotikum	1000x Stammlösung (sterilfiltriert)
Apramycin	50 mg/ml in MQ
Cycloheximid	80 mg/ml in 100% Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml in MQ
Phosphomycin	25 mg/ml in MQ
Thiostrepton	25 mg/ml in DMSO

Tabelle 5.13: Verwendete Antibiotika- *E. coli*

Antibiotikum	1000x Stammlösung (sterilfiltriert)
Ampicillin	100 mg/ml in 70% Ethanol
Chloramphenicol	25 mg/ml in 70% Ethanol
Kanamycin	50 mg/ml in MQ
Nalidixinsäure	25 mg/ml in 0,4 M NaOH

5.7 Material zur Gelelektrophorese

Tabelle 5.14: Verwendete Agarose- und Polyacrylamidgele- DNA und RNA

Gel-Mix	Zusammensetzung	Menge
Agarose-Gel	Agarose	1%, 3%
	1x TAE	
	autoklavieren	
6% Polyacrylamid-Mix (denaturierend)	40% Acrylamid	75 ml
	10x TBE	50 ml
	8 M Harnstoff	240 g
	MQ	ad 500 ml
	sterilfiltrieren	
15% Polyacrylamid-Mix (denaturierend)	40% Acrylamid	187,5 ml
	10x TBE	50 ml
	8 M Harnstoff	240 g
	MQ	ad 500 ml
	sterilfiltrieren	
6 % Polyacrylamid-Mix (nativ)	40% Acrylamid	10,5 ml
	10x TB	3,5 ml
	MQ	56 ml

Tabelle 5.15: Verwendete Polyacrylamidgele- Protein

Gel-Mix	Zusammensetzung	Menge
Proteingel - Trenngel nach Schägger 10%	40% Acrylamid	15 ml
	3x Gelpuffer	20 ml
	Glycerin	4,6 ml
	MQ	19,8 ml
	10% APS	540 µl
Proteingel - Sammelgel nach Schägger 6%	TEMED	60 µl
	40% Acrylamid	3 ml
	3x Gelpuffer	6,7 ml
	MQ	8,7 ml
	10% APS	540 µl
	TEMED	60 µl

5.8 Oligonukleotide

Tabelle 5.16: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
pK18_fwd	TAGGCACCCCAGGCTTTACACTT	Sequenzierung/ Kolonie-PCR von Plasmiden
pK18_rev	TATTACGCCAGCTGGCGAAA	s.o.
pK18_seq1	CCGGTCTTGTGATCAGGAT	s.o.
pK18_seq2	GCCTACATACCTCGCTCTGCTA	s.o.
km_seqF	GGTTCGAAATGACCGACCAA	s.o.
km_seqR	CCCAGTCTAGCTATCGCCAT	s.o.
kmR_seqF	AGTTTTCGGTATTATCTCTA	s.o.
kmR_seqR	TGAGAGTCGATTGCCAAGAA	s.o.
km_F	CAACAAATTAATGAATTCTCCACCGCATGGAC	s.o.
km_R	TTGTTGACATGTGGAAGCACCCGCGGGCCGCG	s.o.
pGusA_seqF	CTCTAGAGTCGACCTGCAGC	s.o.
pGusA_seqR	TTTATGCGGTGTGAAATACC	s.o.
scr4362	TAACCCGCATGTGAGCCTG	Northern Blot Sonde
scr6925	ATCACCACGCTGAGTCCTT	s.o.
S_2736_3	TCCCCCACGGGCCGACGAT	s.o.
S_2952	TCGCTCGTAGCGACGAAGGTT	s.o.
S_3920	ACAAGGCTAGTTGACTCAGT	s.o.
S_4115_1	TCCCCAGCCCACTGGATCCAGTA	s.o.
S_4115_2	CAGTCCGGGGGACGGGACTCGC	s.o.
5S rRNA	CGA AAT GTA ACC GGG CGT TT	s.o.
4_up_fwd	CGACTCTAGACGTGAACGTCTGTGCGCAGT	Herstellung Deletionsplasmid scr4632
4_up_km_fwd	TACTGAAGCGAACGCCACCCCTGGACAAGGGAAAACGCAA	s.o.
4_up_km_rev	TTGCGTTTTCCCTGTGCCAGGGGTGGCGTTCGCTTCAGTA	s.o.
4_down_km_fwd	TATGAAAGGTTGGGCTTCGGCCGCGATGGCCGTGACCGCA	s.o.
4_down_km_rev	TGCGGTCACGGCCATCGCGCCGAAGCCCAACCTTTCATA	s.o.
4_down_rev	ATCCTCTAGAGACGCAGCGGCCCTCTGGTTG	s.o.

6_up_fwd	CGACTCTAGAGCGGATGCTGCGAGGGTCGA	Herstellung Deletionsplasmid scr6925
6_up_km_fwd	AGCGCGCGGGGCCGTCGGCTCTGGACAAGGGAAAACGCAA	s.o.
6_up_km_rev	TTGCGTTTTCCCTTGTCAGAGCCGACGGCCCCGCGCGCT	s.o.
6_down_km_fwd	TATGAAAGGTTGGGCTTCGGTGGACCTTCGGGGTCCGGTT	s.o.
6_down_km_rev	AACCGGACCCCGAAGGTCCACCGAAGCCCAACCTTTCATA	s.o.
6_down_rev	CAACAATCTAGATCACCGCATTTTGACCGACTT	s.o.
2del_1	CAACAAGCGGCCGCGGATCCAACAACCGTGTCCGCGCCTT	Herstellung Deletionsplasmid scr2736
2del_2	CAACAAGAATTTCGGGAGGGCCGCTCAAAGCTT	s.o.
2del_3	CAACAATCTAGAATCGTCGGCCCGTGGGGGGA	s.o.
2del_4	CAACAAATCGATGGATCCGGTGGTCTCGGCGCTGTCCACCTT	s.o.
29del_1	CAACAAGTGCAGGGATCCAGCAGCTTGAGGATGGCCGTA	Herstellung Deletionsplasmid scr2952
29del_2	CAACAAGAATTCCGACGGGCCACTTCTCGTAT	s.o.
29del_3	CAACAATCTAGATGGCGGGTTCGGTGCCACTTGAA	s.o.
29del_4	CAACAAATCGATGGATCCCGCTGGTGGCCGGAGCTGA	s.o.
3del_1	CAACAAGTGCAGGGATCCCGCTTGATCAGGATCAGGTGGT	Herstellung Deletionsplasmid scr3920
3del_2	CAACAAGAATTTCGTTTTTCCGTGGATCTGGCCTT	s.o.
3del_3	CAACAATCTAGAGACGTCCGTAGACGTCCGTAGAAGT	s.o.
3del_4	CAACAAATCGATGGATCCCGCGTGGAGACACTCGTCTT	s.o.
41del_1	CAACAAGTGCAGAGATCTTCGTGCGCCGAAACCGCGGTA	Herstellung Deletionsplasmid scr4115
41del_2	CAACAAGAATTCACATCGGGAGCACGCGGCAA	s.o.
41del_3	CAACAATCTAGAGACGGTGCAGCGAGTTTGTA	s.o.
41del_4	CAACAAGTGCAGTCTGCAGAGCGAGGCCACCGGTTTCGTA	s.o.
43del_1	CAACAAGTGCAGGGATCCGGAATCGTTGTACTGCGGAAA	Herstellung Deletionsplasmid scr4389
43del_2	CAACAAGAATTCGCGAACCACCTCCCTTCTGT	s.o.
43del_3	CAACAATCTAGACGTGAGGTGGCTGCGGGCTA	s.o.
43del_4	CAACAAATCGATGGATCCAGATCGCCGAACCCGACAAGGA	s.o.
pGusA_4632_fwd	CAACAAAGATCTCCTCACGCCATGCTTTCACCAT	Herstellung Promotorfusion scr4632 vor das Reporter-gen β-Glucuronidase
pGusA_4632_rev	CAACAAGGTACCTGTAGGCGCCTTTCGGCTCCGT	s.o.
pGusA_29_F	CAACAAAGATCTGGCAGACTCGGACGGCGA	Herstellung Promotorfusion scr2952 vor das Reporter-gen β-Glucuronidase
pGusA_29_R	CAACAAGGTACCCTTGATCGAGCCGGTGCC	s.o.

pGusA_6925_fwd	CAACAAAGATCTCGGCTCGGAGCGCTGAGGCGGCGA	Herstellung Promotorfusion scr6925 vor das Reportergen β -Glucuronidase
pGusA_6925_rev	CAACAAGGTACCGCATCAACGTGGCAACACTGCAAAAGGGA	s.o.
2oe_1	CCACGGGATCCGGCCGGGCGGAGTATTGATTGTAGCTCAC	Herstellung Überexpression scr2736
2oe_2	GTGAGCTACAATCAATACTCCGCCCGCCGGATCCCGTGG	s.o.
2oe_3	GTTGTCTAGACCCGTACCGCCCCGAGTGGTA	s.o.
3oe_1	CGTAGCGACAGCGACCTATCGAGTATTGATTGTAGCTCAC	Herstellung Überexpression scr3920
3oe_2	GTGAGCTACAATCAATACTCGATAGGTCGCTGTCGCTACG	s.o.
3oe_3	GTTGTCTAGACCGATCTGCTGCGCGCGCTGGACGAA	s.o.
4oe_1	TATGAAGCTTGACCTACGCCTTGACCTTGAT	Herstellung Überexpression scr4632
4oe_2	TTGTTGTCTAGACCGTGCTTCTGACTGCGGTCA	s.o.
6oe_1	TATGAAGCTTGACCTACGCCTTGACCTTGAT	Herstellung Überexpression scr6925
6oe_2	GTTGTCTAGACGTGCGTATGTTGTCGT	s.o.
29oe_1	GCTTGATCGAGCCGGTGCCGAGTATTGATTGTAGCTCAC	Herstellung Überexpression scr2952
29oe_2	GTGAGCTACAATCAATACTCGGCACCGGCTCGATCCAAGC	s.o.
29oe_3	CAACAATCTAGAGACCTGCTGCGCGACTGA	s.o.
41oe_1	TACAGCGGGCCGACCCACGCGAGTATTGATTGTAGCTCAC	Herstellung Überexpression scr4115
41oe_2	GTGAGCTACAATCAATACTCGCGTGGGTGCGCCCGCTGTA	s.o.
41oe_3	CAACAATCTAGACGAAATCACCAGCGGTGATTTT	s.o.
43oe_1	GAACCACCTCCCTTCTGTGTGAGTATTGATTGTAGCTCAC	Herstellung Überexpression scr4389
43oe_2	GTGAGCTACAATCAATACTCACACAGAAGGGAGGTGGTTC	s.o.
43oe_3	CAACAATCTAGAGCGCACATCCTGGAACAGAA	s.o.
EMSA_4_F	CAACAAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGCCGAAAG GCGCTACA	Herstellung für Transkription der RNA scr4632
EMSA_4_R	CAACAAAAGCTTGCAGGCGAGCCCGACCGTT	s.o.
EMSA_6_F	CAACAAGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCAGTGTGCCA CGTTGATGC	Herstellung für Transkription der RNA scr6925
EMSA_6_R	CAACAAAAGCTTGCAGCGGCGCCCGAGAGCGG	s.o.
6924_F1	GGCACACAGAACCGTAGTGA	qRT-PCR für Gen SCO6924
6924_R1	CTCGACGAGGTGGTGTCTT	s.o.
6924_F2	GGCAGGTCAAGGCGTAAAC	s.o.
6924_R2	GACGAGGTGGTGTCTTGC	s.o.

6925_F1	GGGAGTTGAATCATCCCTTG	qRT-PCR für Gen SCO6925
6925_R1	GGATCTTGGCGTATTTACCG	s.o.
6925_F2	AGCGTCGCAGCTGATAATG	s.o.
6925_R2	CCGTCGTTTCGACAGAGAGTA	s.o.
hrdB1_F	TGGTCGAGGTCATCAACAAG	qRT-PCR für Referenzgene in <i>S. coelicolor</i>
hrdB1_R	TGGACCTCGATGACCTTCTC	s.o.
Random Hexamere	NNNNNN	cDNA-Synthese mit der SuperScript® IV Reverse Transcriptase

Random Hexamere wurden bei Thermo Fisher, Darmstadt bestellt, alle anderen Oligonukleotide bei Sigma Aldrich.

5.9 Plasmide

Tabelle 5.17: Plasmidverzeichnis

Plasmid	genetische Marker	Referenz
pK18	ColE1 <i>origin</i> , aphII, Lac, LacO, LacZ alpha	Dr. Günther Muth, Tübingen
pK18_6925_koab	ColE1 <i>origin</i> , aphII, Lac, LacO, LacZ alpha; Deletionskassette aus <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Bereichen von scr6925 und einer Kanamycinresistenz.	Diplomarbeit Nona Heueis, AG Süß, Frankfurt
pGM1190	Shuttle Plasmid für <i>E. coli</i> und Streptomyeten; <i>oriT</i> , <i>aac3(V)</i> , <i>tsr</i>	Dr. Günther Muth, Tübingen
pGM1190_4632oe	Shuttle Plasmid für <i>E. coli</i> und Streptomyeten; <i>oriT</i> , <i>aac3(V)</i> , <i>tsr</i> mit inseriertem SF14-Promotor und Sequenz der sRNA scr4632	Diplomarbeit Nona Heueis, AG Süß, Frankfurt
pGM1190_6925oe	Shuttle Plasmid für <i>E. coli</i> und Streptomyeten; <i>oriT</i> , <i>aac3(V)</i> , <i>tsr</i> mit inseriertem SF14-Promotor und Sequenz der sRNA scr6925	Diplomarbeit Nona Heueis, AG Süß, Frankfurt
pGMsT	pGM1190 ohne <i>tsr</i> , mit Terminatorstamm hinter MCS	Dr. Michael Vockenhuber; AG Süß, Darmstadt
pGMsT_2736_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr2736, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_2952_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr2952, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_3920_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr3920, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_4115_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr4115, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_4632_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr4632, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_4389_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr4389, Terminatorschleife	diese Arbeit
pGMsT_6925_oe	Überexpressionskassette: SF14-Promotor, scr6925, Terminatorschleife	diese Arbeit

pGusA	ColE1 <i>origin</i> , aac3(IV), gusA, oriT, traJ, phage phic31 attp + Integrase	Dr. Michael Vockenhuber; AG Süß, Darmstadt
pGusA_29prom	Promotorregion von scr2952 (105 bp <i>upstream</i> und die ersten 20 bp von scr2952) vor gusA	diese Arbeit
pGusA_4prom	Promotorregion von scr4642 (105 bp <i>upstream</i> und die ersten 20 bp von scr4632) vor gusA	diese Arbeit
pGusA_6prom	Promotorregion von scr6925 (105 bp <i>upstream</i> und die ersten 20 bp von scr6925) vor gusA	diese Arbeit
pJET1.2	CloneJET PCR Cloning Kit; <i>bla</i> , <i>rep</i> (pMB1)	ThermoFisher, Darmstadt
pJetkmR	pJet-Plasmid mit Kanamycin-Resistenz	Dr. Michael Vockenhuber; AG Süß, Darmstadt
pCK	ColE1 <i>origin</i> , aac(3)IV, gusA, LacZ alpha	Dr. Maksym Myronovskyi; AG Luzhetskyy, Saarbrücken
pCK_2736_del	inseriert in BamHI: 1000 bp <i>upstream</i> scr2736- <i>aphII-oriT</i> -1000 bp <i>downstream</i> scr2736	diese Arbeit
pCK_2952_del	inseriert in BamHI: 1000 bp <i>upstream</i> scr2952- <i>aphII-oriT</i> -1000 bp <i>downstream</i> scr2952	diese Arbeit
pCK_4632_del	inseriert in XbaI: 1000 bp <i>upstream</i> scr4632- <i>aphII-oriT</i> -1000 bp <i>downstream</i> scr4632	diese Arbeit
pCK_4389_del	inseriert in BamHI: 1000 bp <i>upstream</i> scr4389- <i>aphII-oriT</i> -1000 bp <i>downstream</i> scr4389	diese Arbeit
pCK_6925_del	inseriert in XbaI: 1000 bp <i>upstream</i> scr6925- <i>aphII-oriT</i> -1000 bp <i>downstream</i> scr6925	diese Arbeit

5.10 Bakterienstämme

Tabelle 5.18: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	genetische Marker	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(rK-, mK-), eIA1, supE44	Ausubel, 1990
<i>Escherichia coli</i> ET 12567- pUZ8002	F-, <i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201::Tn10</i> , <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>sG4</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtl1</i> , <i>glnV44</i> ; CmR, TcR, KmR	Chater, 2002
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	prototroph	Bentley, 2000
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	prototroph; pGMs	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_pGusAH	prototroph; pGusAH	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_2oe	prototroph; pGMsT_2736_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_2del	prototroph; Δscr2736 Kan ^R	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_29oe	prototroph; pGMsT_2952_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_29del	prototroph; Δscr2952 Kan ^R	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_3oe	prototroph; pGMsT_3920_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_41oe	prototroph; pGMsT_4115_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_43oe	prototroph; pGMsT_4389_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_43del	prototroph; Δscr4389 Kan ^R	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_4oe	prototroph; pGMsT_4632_oe	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_4delP	prototroph; pCK_4del inseriert, <i>upstream</i> scr4632	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_6oe	prototroph; pGMsT_6925_oe	diese Arbeit

<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_6delP	prototroph; pCK_6del inseriert, <i>upstream</i> scr6925	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_29prom	prototroph; pGusA_prom_scr2952	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_4prom	prototroph; pGusA_prom_scr4632	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145_6prom	prototroph; pGusA_prom_scr6925	diese Arbeit

5.11 Software

Tabelle 5.19: Softwareverzeichnis

Software	Version	Bezugsquelle
BLAST		National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, USA [H1]
ClustalOmega		EMBL-EBI, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK [H2]
Corel Draw 11	V11.633	Corel Corporation
Edit Seq	V7.1.0 (44)	GATC Biotech, Konstanz
ImageJ	V1.45	National Institutes of Health
IntaRNA	V1.2.5	Freiburg RNA tools, Universität Freiburg [H3]
Irfan View	V4.27	Irfan Skiljan
mfold web server		mfold web server; The RNA Institute, College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany [H4]
Microbial Genomes		National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, USA [H5]
Microbial Genome Viewer	V2.0	University Medical Center, Radboud umc, Nijmegen, Niederlande [H6]
Reverse Complement		The Sequence Manipulation Suite, Stothard, P. 2000
RNAfold web server		Institute for Theoretical Chemistry, Universität Wien [H7]
SeqMan	V7.1.0 (44.1)	GATC Biotech, Konstanz
Sigma Blot		Systat Software Inc., USA
StrepDB		The Streptomyces Annotation Server
StreptoBLAST		Genome Project of <i>Streptomyces avermitilis</i>
UCSC In-Silico PCR		UCSC Genome Bioinformatics Group
Vector NTI Advance	V11.0	Invitrogen, Darmstadt

5.12 Methoden

5.12.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.12.1.1 Autoklavieren

Lösungen und Medien, sowie Hilfsmittel wurden bei 121°C feuchter Hitze und 2 bar für 20 min sterilisiert.

5.12.1.2 Sterilfiltrieren

Hitzelabile Lösungen können nicht durch Autoklavieren sterilisiert werden, sondern wurden durch Filtration keimfrei gemacht. Glucose wurde sterilfiltriert, da sie während des Autoklavierens karamellisiert. Harnstoff und Harnstoff enthaltende Lösungen wurden zur Entfernung nicht gelöster Kristalle ebenfalls sterilfiltriert.

5.12.1.3 Polyacrylamid- und Agarose-Gele zum Nachweis von Nukleinsäuren

In der Molekularbiologie ist die Untersuchung und Unterscheidung der Größe von DNA und RNA von zentraler Bedeutung. Die Gelelektrophorese mit Agarose- und Polyacrylamidgelen ermöglicht diese Untersuchungen. Agarosegele trennen weniger genau und werden daher für größere Fragmente verwendet. Polyacrylamidgele erlauben eine genauere Auftrennung auch kleinerer DNA- oder RNA-Stücke sowie von Proteinen. Die Detektion der Nukleinsäuren in Gelen erfolgte durch Ethidiumbromidfärbung und anschließender Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm).

5.12.1.3.1 Polyacrylamid-Gele

Der Polyacrylamid-Mix nach Rezept, sowohl denaturierend als auch nativ, wurde mit 1/100 Vol. 10% APS und 1/1000 Vol. TEMED gemischt, auf dem Magnetrührer verrührt und mit einer sterilen Einmalpipette zwischen zwei saubere Glasplatten pipettiert. Die Größe der *spacer* beeinflusste die Dicke des Gels und somit die Polymerisierungszeit. Für Protein- und RNA-Gelen wurde ein unterschiedlicher Polyacrylamid-Mix verwendet. Proteingele können gekühlt bei bis zu 200 V, RNA-Gele bei bis zu 1200 V laufen.

5.12.1.3.2 Agarose-Gele

Agarose-Gele wurden mit 1-3% Agarose in 1x TAE-Puffer angesetzt und zum Lösen autoklaviert oder frisch in der Mikrowelle aufgekocht. Die gelöste Agarose kann im Wärmeschrank bei 60°C mehrere Tage gelagert werden. Die flüssige Agarose wurde auf eine waagerechte Makrolonplatte gegossen und der Kamm hineingestellt. Alternativ können Gelgießvorrichtungen verwendet werden. An 1%ige Agarosegele können bis zu 130 V angelegt werden, bei höher konzentrierten Agarosegelen bis zu 200 V.

5.12.1.4 Elution aus Agarose-Gelen

Das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel wurde auf einen UV-Schirm bei 312 nm gelegt und die sichtbar gemachte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Beim Ausschneiden mehrerer Banden muss das Skalpell zwischendurch gut gesäubert werden. Die DNA wurde mittels QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel-Fragment eluiert. Sie wurde in 31,5 µl MQ gelöst, die Konzentration am Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt und auf einem Kontrollgel überprüft.

5.12.1.5 Reinigung von PCR-Produkten oder restringierter DNA

Zur Aufreinigung von Restriktionsansätzen oder PCR-Ansätzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit genutzt.

5.12.1.6 Präzipitation von DNA

5.12.1.6.1 Ethanolfällung

Ein DNA-Ansatz wurde von gelösten Salzen gereinigt, indem die Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,5) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt wurde. Die Suspension wurde gründlich gemischt und für mind. 1h bis über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach wurde die DNA für 1 h bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13.000r pm, 4°C). Der Niederschlag wurde etwa 10 min an der Luft getrocknet und in 31,5 µl MQ resuspendiert.

5.12.1.6.2 Isopropanolfällung

Die Durchführung glich der Ethanolfällung, anstelle von Ethanol wurden 1 Volumen Isopropanol zum Ansatz gegeben.

5.12.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Messung im Nanodrop-Spektrophotometer wurden 1,5 µl der Nukleinsäure-Lösung verwendet. Zusammen mit der zum Spektrophotometer gehörenden Software konnte die Konzentration von DNA und RNA bestimmt werden.

5.12.1.8 Amplifikation von DNA-Fragmenten

5.12.1.8.1 Q5-Polymerase

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus chromosomaler DNA von *S. coelicolor* wurde bevorzugt die Q5-Polymerase (Tab. 5.20) verwendet, da sie eine *proof-reading*-Funktion besitzt. Die Taq-Polymerase verfügt nicht über diese Funktion und ist langsamer (Q5-Polymerase 1 kb in ca. 30 s bei GC-reichem Templat; Taq-Polymerase 1 kb in ca. 60 s). In jedem Fall wird die Elongationszeit der Matrize und der Länge des Konstrukts angepasst (Tab. 5.21). Zusätze wie DMSO oder der Q5 GC-Enhancer können Sekundärstrukturen lösen, die die Polymerase behindern, sowie das unspezifische Binden der eingesetzten Oligonukleotide erleichtern. In GC-reichen Streptomyceten sind Sekundärstrukturen nicht selten.

Tabelle 5.20: Ansatz einer PCR-Reaktion mit der Q5-Polymerase

Reagenz	Menge
Forward-Primer [10 µM]	3 µl
Reverse-Primer [10 µM]	3 µl
dNTPs [10 mM]	3 µl
chromosomale DNA <i>S. coelicolor</i> [1 µg/µl]	1 µl
Q5-Polymerase [5 U/µl]	1 µl
5x Q5 Reaction Buffer	20 µl
MQ	60 µl
DMSO	9 µl
Σ	100 µl

Tabelle 5.21: Programm einer PCR-Reaktion mit der Q5-Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Denaturierung	98°C	4 min	} 30x
Denaturierung	98°C	10 s	
Annealing	x°C	10 s	
Elongation	72°C	x s	
Elongation	72°C	7 min	
Lagerung	8°C	∞	

5.12.1.8.2 *Overlap*-PCR

Eine *overlap*-PCR wurde eingesetzt, wenn mehrere DNA-Fragmente mittels PCR-Reaktion zusammengefügt werden sollten. Hierfür wurden die einzelnen Teile zunächst in separaten PCR-Reaktionen mit der Q5-Polymerase amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide benötigten eine 20 bp lange Überlappung der Sequenz. Eine schematische Darstellung des Oligonukleotiddesigns ist in Abbildung 3.13 zu finden. In die *overlap*-PCR wurden jeweils 5 µl der amplifizierten und aufgereinigten Einzel-PCRs eingesetzt (Tab. 5.22). Es ist möglich auch mehr als nur zwei Fragmente zu vereinen. Die Menge des eingesetzten MQs in die Reaktion wird dann verringert, die Elongationszeit erhöht. Das Programm der *overlap*-PCR beinhaltete neben dem normalen

Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation zusätzlich einen vorgeschobenen Zyklus der Schritte (Tab. 5.23). Die einzelnen DNA-Fragmente können sich so leichter anlagern.

Tabelle 5.22: Reaktionsansatz einer *overlap*-PCR

Reagenz	Menge
DNA-Fragment 1	5 µl
DNA-Fragment 2	5 µl
Forward-Primer [10 µM]	3 µl
Reverse-Primer [10 µM]	3 µl
dNTPs	2 µl
5x Q5 Reaction Buffer	20 µl
MQ	61 µl
Q5-Polymerase [5 U/µl]	1 µl
Σ	100 µl

Tabelle 5.23: PCR-Programm einer *overlap*-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Denaturierung	98°C	1 min	
Annealing	45°C	1 min	
Elongation	72°C	x s	
Denaturierung	98°C	10 s	} 30 x
Annealing	46°C	30 s	
Elongation	72°C	x s	
Elongation	72°C	7 min	
Lagerung	8°C	∞	

5.12.1.9 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen werden vom Hersteller mit den passenden Puffersystemen geliefert. Die nötige Enzymmenge wurde in Abhängigkeit von der zu verdauenden Menge DNA, der Anzahl der Schnittstellen des verwendeten Enzyms auf der DNA und des Gesamtvolumens des Ansatzes ermittelt.

$$\text{Benötigte Units} = \frac{\text{Referenz DNA (meist- } \lambda \text{ DNA)} [\text{nt}] * \text{Schnittstellen auf der zu verdauenden DNA}}{\text{zu verdauende DNA} [\text{nt}] * \text{Schnittstellen auf der Referenz DNA}}$$

Die Enzyme sind in Glycerin gelagert, weshalb der Ansatz so dimensioniert werden muss, dass die Endkonzentration von 10% Glycerin nicht überschritten wird - speziell bei Restriktionsansätzen mit mehreren gleichzeitig eingesetzten Enzymen. Meist erfolgt die Inkubation für 1 h bei 37°C. Die Empfehlungen des Herstellers für jedes Enzym sind immer zu beachten.

5.12.1.10 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Antarktische Phosphatase (New England Biolabs, USA) wurde verwendet, um die Phosphatgruppen von linearisierten DNA-Plasmiden zu entfernen und eine Re-Ligation des Plasmids zu vermeiden. Die Phosphatase wurde dem Restriktionsansatz direkt zugefügt, wenn das Enzym mit den verwendeten Puffern kompatibel war. Andernfalls wurde die DNA aufgereinigt und die Dephosphorylierung in einem eigenen Ansatz durchgeführt. Der Dephosphorylierungsansatz

wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Auch vom 5'-Ende einer RNA kann die Antarktische Phosphatase das Phosphat entfernen und diese für die radioaktive Markierung vorbereiten.

5.12.1.11 Ligation von DNA

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mittels der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, USA) unter vom Hersteller empfohlenen Bedingungen ligiert. Die Ligation des DNA-Fragments erfolgte in Bezug auf die Plasmid-DNA in 5fachem molaren Überschuss.

$$\text{Menge Insert [ng]} = \frac{(5 \cdot 25 \text{ ng Plasmid}) \cdot \text{Insert [nt]}}{\text{Plasmid [nt]}}$$

Einfachere Ligationen können für 3 h bei Raumtemperatur ablaufen, schwierigere Ligationen sollten bei 16°C über Nacht inkubieren. PEG 6000 (100 % w/v) kann als Zusatz bei schwierigeren Ligationen, wie *blunt end*-Ligationen, zugegeben werden. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt. Gleich im Anschluss erfolgte eine Transformation in *E. coli*.

5.12.2 *Escherichia coli*- spezifische Methoden

5.12.2.1 Anzucht von *E. coli* auf Festmedium

E. coli- Zellen wurden auf LB-Agar mit passendem Selektionsmarker ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert.

5.12.2.2 Anzucht von *E. coli* in Flüssigmedium

In einem Reagenzglas oder Schikanekolben autoklaviertes LB-Medium wurde nach dem Abkühlen mit 1/1000 Volumen Antibiotikum versetzt und mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens mit einer einzelnen *E. coli*- Kolonie beimpft. Die Kultur wurde für 16 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert.

5.12.2.3 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-DH5α-Zellen

DH5α-Zellen aus dem Glycerinstock bei -80°C wurden auf einer Platte mit LB-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine 4 ml LB-Flüssigkultur mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde die 4 ml LB-Kultur verwendet, um eine 200 ml LB-Kultur zu inokulieren. Sie wurde bei 150 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Bei Erreichen der optischen Dichte wurde der Schikanekolben 30 min auf Eis gekühlt, die Zellen im 50 ml Reaktionsgefäß geerntet, mit 1 Volumen eiskaltem 0,1 M CaCl₂ gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden eine weitere Stunde auf Eis inkubiert und dann mit gekühltem Glycerin (15 % Endkonzentration (v/v)) versetzt. Die Zellsuspension wurde zu je 330 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert. Jedes Aliquot darf nur einmal aufgetaut werden. Die Effizienzbestimmung wurde nach Hanahan *et al.* mit dem pUC19-Plasmid durchgeführt. CFU-Werte ab 10⁶ wurden als kompetent verwendet. (Hanahan, 1983)

5.12.2.4 Transformation CaCl₂- kompetenter *E. coli*-DH5α-Zellen

Bei -80°C gelagerte CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 100 µl der 330µl-Aliquots wurden zu je 1 µl des zu transformierenden Plasmids gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellen für 1 min auf 42°C einem Hitzeschock unterzogen und weitere 15 min auf Eis inkubiert. 1 ml vorgewärmtes LB-Medium wurde zugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C und 1000 rpm geschüttelt. Die *E. coli*-Zellen wurden 2 min bei 13.300 rpm geerntet, etwa 900 µl Überstand abgenommen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Die

Suspension wurde anschließend auf LB-Platten mit passendem Selektionsmarker ausgestrichen und bei 37°C 14-17 h inkubiert.

Das Protokoll einer Retransformation entsprach dem der Transformation, die Inkubationszeiten waren aber verkürzt. Die Erstinkubation auf Eis betrug 15 min, der Hitzeschock wurde auf nur 15 s verringert und die Zwischeninkubation auf Eis betrug 10 min. Das Auskeimen dauerte nur 15 min.

5.12.2.5 Kolonie-PCR mit *E. coli*

In Tabelle 5.24 ist der Ansatz einer Kolonie-PCR aufgeführt. Er wurde als Mastermix pipettiert und für die PCR in PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Mit einem sterilen Holzstäbchen wurde eine einzelne Kolonie von der Transformationsplatte aufgenommen und anschließend kurz auf eine neue LB-Platte mit passendem Selektionsmarker getupft. Direkt im Anschluss wurden die restlichen Zellen des gleichen Holzstäbchens in einen PCR-Ansatz eingerührt. Hierbei sollten die Holzstäbchen möglichst spitz sein, damit die Kolonien einzeln aufgenommen werden können und sich die Zellen gut ablösen lassen. Die *E. coli*-Zellen dienen als Template der Kolonie-PCR. Eine Negativkontrolle mit dem Ausgangsplasmid als Template wurde mitgeführt.

Tabelle 5.24: Kolonie-PCR aus *E. coli*

Reagenz	Menge
MQ	20,25 µl
10x ThermoPolPuffer	2,5 µl
Forward-Primer [10 pmol/µl]	0,75 µl
Reverse-Primer [10 pmol/µl]	0,75 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
Σ	25 µl

Das PCR-Programm für eine Kolonie-PCR aus *E. coli* ist in Tabelle 5.25 aufgeführt. Die Annealing-Temperatur sollte 5-10°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide liegen. Je nach verwendeter Polymerase wird die Elongationszeit der Länge des gewünschten PCR-Produktes angepasst. Die Taq-Polymerase amplifiziert ca. 1 kb DNA pro Minute, während die Q5-Polymerase ungefähr 2 kb pro Minute amplifizieren. Die DNA aus der PCR-Reaktion wird je nach Größe auf einem 1- 3% Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 5.25: Programm zur Kolonie-PCR aus *E. coli*

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Denaturierung	96°C	4 min	} 25x
Denaturierung	96°C	30 s	
Annealing	x°C	30 s	
Elongation	72°C	x s	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlen	8°C	∞	

5.12.2.6 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Plasmidpräparation wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit von QIAGEN verwendet (Tab. 5.1.3). Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 31,5 µl MQ gelöst und die Konzentration am Nanodrop-

Spektrophotometer bestimmt. Auf einem 1% Agarosegel wurde die DNA überprüft und bei -20°C gelagert.

5.12.3 *Streptomyces coelicolor*- spezifische Methoden

5.12.3.1 Ausplattieren von Sporen auf Festmedium

Der Sporenstock wurde bei -80°C zu 10^9 Sporen/ml in 20% Glycerin gelagert und auf Eis aufgetaut. Je nach Versuchsansatz wurden 5 µl der Sporenlösung pro kleiner Petrischale (92x16 mm) oder 10 µl Sporenlösung pro großer Petrischale (150x20 mm) in 0,1-1 ml 3% TSB-Medium aufgenommen und für 10 min bei 50°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Dem Hitzeschock folgte eine Auskeimungsphase von 3 h bei 28°C und 1000 rpm. Pro Platte mit Festmedium wurden 20 µl (kleine Petrischale) bis 500 µl (große Petrischale) der Suspension mit einem sterilen Glasstab ausgestrichen. Die Platten wurden je nach Bedarf 3-12 Tage bei 28°C inkubiert.

Streptomyceten reagieren sehr sensibel auf Änderungen ihrer Umwelt - sogar auf unterschiedlich dick gegossene Nährböden. Die Menge der Trägermedien wurde daher genauestens dosiert. Pro kleiner Petrischale mit 9 cm Durchmesser wurden 35 ml Medium, 125 ml pro großer Petrischale mit 15 cm Durchmesser verwendet.

5.12.3.2 Ausplattieren von Sporen auf Festmedien mit Folie

Um die Zellernte von Platten mit Festmedien zu erleichtern, kann eine Folie (Einmachfolie, Deti) auf das Festmedium aufgelegt werden. (Hopwood, 1960) Die Folienblätter (25x25 cm) wurden zuvor auf das Maß der Petrischale zugeschnitten und in MQ gewaschen. Die feuchten Zuschnitte wurden, durch Whatman-Papier getrennt, in Alufolie verpackt und autoklaviert. Sie wurden 2h bei 80°C getrocknet und anschließend auf das Festmedium aufgelegt. Die Folien müssen ca. 30 min am Medium antrocknen. Danach kann die Sporensuspension wie auf Festmedium ohne Folie ausgestrichen werden.

5.12.3.3 Sporenernte

Auf eine Platte mit Festmedium, die mit bereits sporulierenden Zellen bewachsen war, wurden mit einem sterilen Zellschaber einige Tropfen 4°C kaltes, 20%iges Glycerin gegeben. Mit der gummierten Seite des Schabers wurde über die befeuchtete Oberfläche des Myzels gefahren. Die sich an der Gummierung sammelnden Sporen wurden in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß, das ca. 25 ml kaltes 20%iges Glycerin enthielt, gesammelt. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis alle Platten abgeerntet waren. Der Inhalt des 50 ml Reaktionsgefäßes wurde in eine sterile 20 ml Spritze überführt, die etwa zur Hälfte mit Watte befüllt war. Durch Ausdrücken der Watte wurden die geernteten Sporen von Agar- und Zellresten getrennt und in einem neuen 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Sporen-Glycerin-Mischung wurde 10 min bei 10.350 rpm abzentrifugiert und die Sporen in kleinem Volumen (2-5 ml) 20% Glycerin resuspendiert. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde der Sporentiter bestimmt und auf 10^9 Sporen/ml eingestellt. Der fertige Sporenstock wurde anschließend in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.12.3.4 Vereinzeln von Streptomyceten-Kolonien

Mit einem sterilen, langen Holzstäbchen wurden möglichst einzelne Zellen einer Streptomyceten-Kolonie aufgenommen und auf einer neuen Platte mit Festmedium ausgestrichen. Da Streptomyceten in einem dichten Geflecht wachsen, müssen mehrere Vereinzlungsdurchgänge

erfolgen, um die Zellen wirklich voneinander zu trennen. Die Platten wurden anschließend bei 28°C inkubiert.

5.12.3.5 Zellernte von Platten mit Festmedien

Wenn die Zellen auf Festmedium mit auf dem Medium aufgelegter Folie ausgestrichen wurden, konnten die gewachsenen Zellen mit einem Zellschaber von der Folie abgenommen werden. Die geernteten Zellen wurden mit einem Spatel in 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel und 200 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm) überführt. Wurden die Zellen auf Festmedium ohne Folie ausgestrichen, so wurde ebenfalls ein Zellschaber für die Ernte benutzt. Das Abnehmen der Zellen musste vorsichtiger erfolgen, um nicht mehr Medium als nötig mit dem Schaber abzutragen. Die geernteten Zellen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße mit Glasperlen überführt. Bei beiden Erntemethoden wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C oder -80°C gelagert.

5.12.3.6 Anzucht von Streptomyceten in Flüssigmedium

50 ml Medium wurde in einem 250 ml Schikanekolben autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden dem Medium die nötigen Antibiotika (50 µl einer 1000x Stammlösung) hinzugefügt. Pro Kolben wurden 50 µl eines Sporenstocks zu 10^9 Sporen/ml in 150 µl 3% TSB-Medium aufgenommen und einem 50°C Hitzeschock ausgesetzt. Die 2 ml Reaktionsgefäße wurden zum Auskeimen bei 28°C für 3h bei 1000 rpm geschüttelt. Danach wurden die Kolben mit der entsprechenden Menge Sporensuspension beimpft. Die Kolben wurden bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Die Inkubationszeit variierte je nach Medium und zu erreichender Wachstumsphase zwischen 24 h und 120 h.

5.12.3.7 Zellernte aus einer Streptomyceten-Flüssigkultur

Die Zellernte aus einer Streptomyceten-Flüssigkultur kann entweder in einem 50 ml Reaktionsgefäß oder mittels Sechsfach-Filtrationssystem erfolgen. Bei der Ernte im Reaktionsgefäß wurde die Flüssigkultur komplett in das Gefäß überführt und etwa 10 min bei 10.350 rpm in der Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 ml sterilem MQ resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet mit einem Spatel in sterile 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel überführt. Je nach weiterem Versuchsablauf enthielten die Reaktionsgefäße bereits 200 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm).

Bei Ernte mit Hilfe des Filtrationssystems wurde die zu erntende Kultur in die mit Filtern versehenen Erntebecher gefüllt. Die Flüssigkeit wurde durch eine Pumpe abgesaugt. Sobald die Becher leer waren, wurde das entstandene Pellet mit einem Volumen sterilem MQ gewaschen. Je nach gewachsener Zelldichte neigten die Filter dazu zu verstopfen. Mit einem sauberen Spatel wurden die Zellpellets vorsichtig zur Seite geschoben und der Filter wieder durchgängig gemacht. Das Zellpellet wurde mit einem Spatel in 2 ml Reaktionsgefäße (evtl. mit 200 µl Glasperlen) überführt, sofort in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

5.12.3.8 Konjugation in Streptomyceten

Es wird ein Plasmid mit *oriT* benötigt, welches den Transfer der DNA von *E. coli* in Streptomyceten ermöglicht. Das Methylierungsmuster von *E. coli* und *S. coelicolor* unterscheidet sich, weshalb von *E. coli* methylierte DNA nicht von den Streptomyceten aufgenommen werden würde. Als *E.coli*-Stamm wurde *E. coli* ET12567-pUZ8002 (Cm^R, Km^R, TC^R) verwendet, bei dem die Dam-Methylase inaktiviert ist. Da die DNA durch diesen Stamm nicht methyliert wird, kann das Plasmid mittels Konjugation übertragen werden. Es wurde eine ausführliche Transformation des zu konjugierenden Plasmids in *E. coli* ET12567-pUZ8002 durchgeführt. Die über Nacht gewachsenen

E. coli-Zellen wurden morgens mit der Impföse zu einem dichten Rasen ausgestrichen und etwa 8 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden 10 µl der Streptomyceten-Sporen (10^9 Sporen/ml) in 300 µl 3% TSB-Medium aufgenommen, für 10 min einem 50°C Hitzeschock ausgesetzt und bei 28°C und 1000 rpm inkubiert. Pro Konjugation wurde ein eigener Sporenanatz angesetzt.

Nach etwa 8 h wurde die Hälfte der *E. coli*-Zellen mit der Impföse von der Platte abgenommen und zu den ausgekeimten Streptomyceten-Sporen ins Flüssigmedium gerührt. Die Zellen wurden gründlich miteinander gemischt und anschließend auf SM-Platten mit 10 mM MgCl₂ und 80 µg/ml Cycloheximid ausplattiert. Die Platten wurden bei 28°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten mit 3 ml Weichagar (SNA) und je 30 µl Selektionsmarker sowie 30 µl Phosphomycin oder Nalidixinsäure überschichtet. Die Platten wurden so lange bei 28°C inkubiert, bis einzelne Streptomyceten-Kolonien durch die Weichagarschicht hindurchgewachsen waren und vereinzelt werden konnten.

5.12.3.9 RNA-Extraktion aus Streptomyceten

Streptomyceten einer Kultur, flüssig oder auf Festmedium, wurden geerntet und 2 Spatelspitzen der geernteten Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße mit je 200 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm) überführt. Jedem Reaktionsgefäß wurden 300 µl Extraktionspuffer, 20 µl 20%iges SDS und 300 µl Phenol zugegeben. Der Schraubdeckel wurde sorgfältig verschlossen, dabei wurde besonders auf Glasperlen im Gewinde geachtet, die zu Undichtigkeit führen könnten. Dann wurden die Zellen vier Mal direkt hintereinander für 1 min bei 6 m/s in der Fastprep® aufgeschlossen und für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne Interphase in ein neues Reaktionsgefäß (Maxtract High Density Tube 2 ml, QIAGEN) überführt und mit 500 µl Cl (Chloroform/Isoamylalkohol 25:1) versetzt. Die Lösungen wurden durch Schütteln per Hand sorgfältig vermischt und wieder 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß ohne Schraubdeckel überführt. Das DNA-RNA-Gemisch („XNA“) wurde mit 10% 3 M Natrium-Acetat (pH 6,5) und 1 Volumen Isopropanol mind. 2 h bis über Nacht bei -80°C gefällt.

Anschließend wurden die Proben für 1 h bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 700 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Hierzu wurde am Rand des Reaktionsgefäßes entlang mit der sterilen Pipettenspitze von oben auf das Pellet gestochen, bis es sich vom Rand löste. Es wurde erneut für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft etwa 15 min getrocknet. Danach wurde das XNA-Pellet in 500 µl MQ gelöst. Der Lösevorgang wird erleichtert, wenn das Pellet wiederholt bei -80°C eingefroren wird. Die Konzentration der XNA wurde mit dem Nanodrop-Spektrophotometer in einer 1:10 Verdünnung bestimmt. Je Probe wurden 1 µg XNA mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt und für 15 min bei 96°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Der 1 kb peqGold DNA-Leitermix diente als Marker.

Um noch vorhandene DNA aus dem Nukleinsäuregemisch zu entfernen, wurden 100 µg XNA mit 2 µl TurboDNase für 1 h bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde mit 10% 3 M Natriumacetat (pH 6,5) und 1 Volumen Isopropanol über Nacht bei -80°C gefällt. Anschließend wurde 1 h bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 32,5 µl MQ gelöst. Auch hier hilft wiederholtes Einfrieren beim Lösevorgang. Konzentration und Qualität der RNA wurden wie oben beschrieben überprüft.

5.12.3.10 Analyse der antibiotischen Wirkung einer von *S. coelicolor* sezernierten Substanz

Die Analyse ob eine von *S. coelicolor* sekretierte Flüssigkeit antibiotisch aktiv ist, kann auf Festmedium oder in Flüssigkultur erfolgen. Für die Überprüfung auf Festmedium wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* K12, *E. coli* W207, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* (Gram-negativ) und *Micrococcus luteus* sowie *Bacillus subtilis* (Gram-positiv) auf LB-Medium ausgestrichen. Auf die Zellen wurden Filterplättchen gelegt und mit einigen Kontrollantibiotika und der zu überprüfenden Substanz betropft. Die *E. coli*-Stämme, *S. marcescens* und *B. subtilis* wurden bei 37°C, *M. luteus* und *P. fluorescens* bei 28°C inkubiert.

Für die Determinierung einer antibiotischen Wirkung in Flüssigmedium wurden die einzelnen Bakterienstämme in einer 4 ml LB-Flüssigkultur über Nacht inkubiert (Inkubationstemperatur siehe Festmedium). Am nächsten Morgen wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte überimpft. Die Kontrolle bestand nur aus LB-Medium und Zellen (198 µl LB, 2 µl Zellen) bzw. aus Medium mit zu testender Flüssigkeit. Zur Überprüfung der Aktivität der Substanz wurden jeweils 2 µl Zellen aus den Vorkulturen sowie 10%, 1% und 0,25% der zu analysierenden Flüssigkeit in die Wells gegeben und auf 200 µl mit LB-Medium aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte schüttelnd und getrennt nach Temperaturen. Nach 16 h wurde das Wachstum per OD_{600} im Tecan-Reader (Safire 2) bestimmt.

5.12.3.11 Anfärben von Myzel und Sporen im Mikroskop

Beim Mikroskopieren von Streptomycceten kann es sinnvoll sein die Myzelien für einen besseren Kontrast anzufärben. Hierzu eignet sich der Farbstoff Baumwollblau. 0,05 g Baumwollblau (Color Index 42780, Sigma Aldrich) werden in 30 ml Milchsäure (80-85%, Sigma Aldrich) gelöst und für 2 h auf dem Magnetrührer vermischt. Die Flüssigkeit muss 24 h stehen und kann anschließend sterilfiltriert werden. Die filtrierte Lösung ist sofort verwendbar und wird direkt auf das Myzel auf dem Objektträger getropft.

5.12.4 RNA-spezifische Methoden

5.12.4.1 ssRNA-Leiter

Um in einem Northern Blot als Marker verwendet werden zu können, muss die Low Range ssRNA Leiter (New England Biolabs, USA) radioaktiv markiert werden. Hierzu wurde zunächst das Polyphosphat-Ende vom 5'-Ende der RNA entfernt (siehe Tab. 5.26). Der Dephosphorylierungsansatz wurde für 30 min bei 50°C inkubiert, bei 96°C für 10 min denaturiert und auf Eis gestellt.

Tabelle 5.26: Dephosphorylierung der Low Range ssRNA Leiter

Reagenz	Menge
ssRNA-Leiter	5 µl
10x CIP-Puffer	2 µl
Calf-Intestine-Pyrophosphatase [1 U/µl]	1 µl
MQ	12 µl
Σ	20 µl

Direkt im Anschluss wurde die dephosphorylierte Leiter zur radioaktiven Markierung verwendet. Dafür wurden 10 µl der Leiter mittels T4 Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, USA) und ^{32}P -radioaktiv markiertem γ -ATP (spez. Aktivität 6000 Ci/mmol, Hartmann Analytic) für 3 h bei

37°C inkubiert (Tab. 5.27). Die Kinase transferierte das radioaktive γ -Phosphat an das freie 5'-OH der RNA.

Tabelle 5.27: Transfer des radioaktiven Phosphats auf das 5'-Ende der ssRNA-Leiter

Reagenz	Menge
CIP-behandelte ssRNA-Leiter	10 μ l
MQ	163 μ l
10x Polynukleotid-Kinase Puffer	10 μ l
T4 Polynukleotid Kinase [100 U/ μ l]	3 μ l
γ -32P -ATP [1,5 μ M]	4 μ l
Σ	200 μ l

Der Ansatz wurde über eine Sephadex G25-Säule (GE-Healthcare, München) aufgereinigt und mit 150 μ l 2x RNA-Ladepuffer versetzt. Der fertige Marker wurde im Bleigefäß auf -20°C gelagert. Die radioaktiv markierte Leiter muss vor jedem Gebrauch im Liquid Scintillation Counter 1409 (Wallac, Monza) vermessen werden. Es werden 200.000 cpm pro Spur auf das Gel aufgetragen.

5.12.4.2 Northern Blot

Vorbereitung am Vortag

Am Tag vor der Durchführung des Northern Blots wurden 1 l 1x TBE pro Gel und 5 l 1x TBE pro 1-2 Gelen vorbereitet, wobei die 5 l 1x TBE auf 4°C vorgekühlt wurden.

Polyacrylamid-Gel für den Northern Blot

Ein 20x20 cm großes, denaturierendes PAA-Gel (6% PAA, 8 M Harnstoff) mit einem Kamm von maximal 15 Spuren wurde vorbereitet. Die RNA wurde auf 15 μ g je Probe eingestellt und mit 2x RNA-Ladepuffer versehen. Sie wurde für 15 min auf 96°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Radioaktiv markierte Low Range ssRNA Leiter wurde auf 200.000 cpm aliquotiert aufgekocht und abgekühlt. Die Spuren am Rand des Gels sowie zwischen der Leiter und den Proben wurden frei gelassen.

Vorbereitung am Tag des Northern Blots

Die RNA wurde in 1x TBE für etwa 1 h bei 20 W im PAA-Gel aufgetrennt, bis der Blaumarker etwa $\frac{3}{4}$ der Laufront erreicht hatte. Während das Gel lief, konnten die Materialien für den Blotting-Vorgang vorbereitet werden: 1x GE Hybond N+ Membran pro Gel, 6x Whatman-Papier pro Gel, eine sterile RNase-freie Plastikpipette. Kurz bevor das Gel weit genug gelaufen war, wurde der Tankblotter mit 4,5 l vorgekühltem 1x TBE befüllt. Der restliche 1x TBE wurde in eine Plastikschaale gefüllt.

Blotting-Vorgang

Als der Blaumarker bei $\frac{3}{4}$ der Laufront angekommen war, wurde das PAA-Gel aus der Apparatur genommen, die *spacer* sowie die obere Glasplatte entfernt. Eine Blot-Halterung wurde aus dem Tankblotter herausgenommen und aufgeklappt auf die Arbeitsfläche gelegt. Auf den mit 1x TBE durchtränkten Schwamm des Minuspols (schwarz) wurden nun einzeln drei vorgefeuchtete Whatman-Papiere gelegt und jeweils mit der Pipette rollend Luftblasen entfernt. Dann wurde das PAA-Gel mit der zweiten Glasplatte auf das Whatman-Papier gelegt und anschließend vorsichtig vom Glas getrennt. Das Gel wurde mit 1x TBE angefeuchtet und Luftblasen mit der Pipette entfernt. Die vorbereitete Membran wurde mit einem schwarzen Kuli (andere Stifte wurden während der Hybridisierung abgewaschen) oben in der Mitte beschriftet. Die Membran wurde an zwei Ecken aus der Schutzfolie gehoben, mit 1x TBE benetzt und mittig auf das Gel gelegt (die

Membran darf nicht mehr verschoben werden, da die Banden sonst verschmieren). Eventuelle Luftblasen wurden sehr vorsichtig entfernt, damit sich das Gel unter der Membran nicht verschiebt. Auf die Membran wurden wieder drei vorgefeuchtete Whatman-Papiere gelegt und jeweils einzeln die Luftblasen herausgerollt. Anschließend wurde der ebenfalls mit 1x TBE getränkte Schwamm des Pluspols (rot) auf den Aufbau gelegt, die Halterung zugeklappt und fixiert. Sie wurde in die passenden Aussparungen im Tankblotter gesteckt und genau für 1 h bei 50 V geblottet.

Fixierung der RNA auf der Membran

Nach 1 h wurden die Halter aus dem Tankblotter entfernt, das Gel und die Whatman-Papiere auf Strahlung überprüft und entsorgt. Die Membranen wurden in einer Schale im Abzug luftgetrocknet und anschließend für 4 min mit UV-Licht bei 312 nm zur Fixierung bestrahlt. Der fertige Blot kann direkt zur Hybridisierung verwendet werden oder eingeschlagen in Folie in einer abschirmenden Kassette aufbewahrt werden.

Hybridisierung

Der Northern Blot (ohne Folie) wurde gerollt und in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Seite mit der fixierten RNA zeigte nach innen. Die Überlappung der Membran wurde so gewählt, dass die Rollbewegung des Hybridisierungsofens die Hybridisierungsflüssigkeit auch zwischen die sich überschneidenden Membranbereiche schwemmen konnte. 12 ml Hybridisierungsreagenz (Amersham Rapid-Hyb Buffer, GE-Healthcare) wurden in das Röhrchen pipettiert, welches mit einem Deckel mit Dichtring verschlossen wurde. Der Blot wurde nun 1 h bei 42°C gerollt. Dann wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid (der gesamte aufgereinigte Ansatz) in die Hybridisierungslösung pipettiert. Bei der Referenzsonde, der in der Zelle sehr viel stärker exprimierten 5S rRNA, genügt aufgrund der Stärke des Signals auch die Hälfte des Ansatzes des radioaktiv markierten Oligonukleotids. Der Blot wurde für 2 h (5S rRNA) oder über Nacht (alle anderen Sonden) bei 42°C rollend inkubiert.

Nach der Inkubation wurde einmal mit 5x SSC + 0,1% SDS gespült und jeweils einmal für 20 min mit 5x SSC + 0,1% SDS, für 20 min mit 1x SSC + 0,1% SDS und für 20 min mit 0,5x SSC + 0,1% SDS bei 42°C rollend gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Blots aus dem Hybridisierungsröhrchen genommen, luftgetrocknet und wieder in Folie verpackt. Nun wurden sie auf den Phospho Storage Screen (Fujitsu Siemens) aufgelegt.

Die Sonde für die Referenz-RNA 5S rRNA wurde für 2 h exponiert, alle anderen Sonden wurden über Nacht aufgelegt. Der Storage Phosphor Screen wurde am Fujifilm FLA-5000 (Fujitsu) mit einer Auflösung von 50 µm ausgelesen.

Strippen der Northern Blot-Membran

Um bereits ausgelesene Sonden von der Northern Blot-Membran zu entfernen und diesen wieder verwenden zu können, wurde die Membran mit kochendem Wasser und ca. 5 ml 20% SDS für 15 min, auf einer Wippe stehend, gewaschen. Dieser Ablauf wurde drei Mal wiederholt. Die Sonde für die Referenz-RNA 5S rRNA wurde immer als letztes auf den Blot gegeben. Ihr Signal war sehr stark und konnte nur schwer wieder von der Membran entfernt werden.

5.12.4.3 DNA-Oligonukleotide als Sonde

Oligonukleotide für die Verwendung als Sonde in einer Northern Blot-Analyse sollten ca. 20 bp lang sein und möglichst nur ein einziges Mal im Genom binden. Sie werden in 10 µM Konzentration in die Reaktion eingesetzt (Tab. 5.28). Der Markierungsansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und über eine Sephadex G25-Säule (GE-Healthcare, München) aufgereinigt. Der Ansatz

wurde im Blei-Gefäß bei -20°C gelagert oder sofort für die Hybridisierung einer Northern Blot-Membran eingesetzt.

Um sicher zu gehen, dass der Markierungsvorgang erfolgreich war, wurde ein Kontrollgel angefertigt. Es wurden 5 µl des unaufgereinigten sowie des aufgereinigten Ansatzes aufbewahrt und mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt. Sie wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel (15% PAA, 8 M Harnstoff) geladen. Die Proben wurden etwa 1 h bei 150 V aufgetrennt. Das Gel wurde der Elektrophoresekammer entnommen, die Spacer und eine Glasplatte entfernt. Das Gel und die Trägerglasplatte wurden in Folie eingeschlagen und in eine strahlungsdichte Aufbewahrungskassette gelegt. Das Signal konnte im Anschluss durch Auflegen eines Röntgenfilms oder durch Auflegen und Auslesen eines Phospho Storage Screens (Fujitsu Siemens) überprüft werden.

Tabelle 5.28: Reaktionsansatz zum radioaktiven Markieren von DNA-Oligonukleotiden

Reagenz	Menge
MQ	84 µl
Oligonukleotid [10 µM]	2,5 µl
10x Polynukleotid-Kinase Puffer	10 µl
T4 Polynukleotid Kinase [100 U/µl]	1,5 µl
γ-32P -ATP [1,5µM]	2 µl
Σ	100 µl

5.12.4.4 *In vitro*-Transkription

5.12.4.4.1 Herstellung der Plasmide für die *in vitro*-Transkription

An das vorwärts gerichtete Oligonukleotid zur Amplifikation der zu transkribierenden Sequenz wurden der T7-Promotor und die Schnittstelle EcoRI angehängt. Beginnt die zu amplifizierende Sequenz nicht mit einer Guanin-Base (G), wird mit dem Oligonukleotid noch ein G an die Position zwischen T7-Promotor-Sequenz und der zu amplifizierenden Sequenz eingefügt. An das reverse Oligonukleotid wurde die Schnittstelle HindIII angehängt. Nachdem die Sequenz amplifiziert, aufgereinigt und im Agarosegel überprüft worden war, wurde das Fragment mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI-HF und HindIII-HF restringiert. Das Plasmid pSP64 wurde mit den gleichen Enzymen verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt.

Die Ligation von Plasmid und PCR-Fragment erfolgte über Nacht bei 16°C, die Transformation wurde mit *E. coli*-DH5α-Zellen durchgeführt. Die Plasmide wurden mittels Kolonie-PCR überprüft. Eine 100 ml Kultur mit LB-Medium wurde mit einer positiven Testkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 1000 rpm geschüttelt. Morgens wurden 2 ml der Kultur für eine Plasmidpräparation in ein Reaktionsgefäß überführt und das Plasmid isoliert (QIAGEN Plasmid Mini Kit). Die restlichen Zellen wurden in einem 50 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Das aus der Plasmidpräparation isolierte Plasmid wurde zur Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) eingeschickt. Nach Bestätigung der Richtigkeit der Sequenz, wurde das restliche Pellet in einer Plasmidpräparation (QIAGEN Plasmid Maxi Kit) verwendet.

300 µg des isolierten Plasmids wurden mit der Restriktionsendonuklease HindIII-HF über Nacht bei 37°C restringiert. 1 µl der Restriktion wurde auf einem Agarosegel überprüft. Das linearisierte Plasmid wurde in ein Maxtract-Reaktionsgefäß überführt und phenolisiert, 2x mit CI gewaschen und schließlich über Nacht mit 10% 3M Natriumacetat, pH 6,5 und 1 Volumen Isopropanol auf -80°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde 1 h bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit

70% Ethanol gewaschen und in 200 µl MQ gelöst. Die Nukleinsäurekonzentration wurde am Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt und ein Kontrollgel angefertigt.

5.12.4.4.2 Transkription

Die in Tabelle 5.29 aufgeführten Reagenzien wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gründlich gemischt. Zunächst wurde der kleinere Ansatz der Testtranskription angesetzt und nach 1 h bei 37°C ein Kontrollgel angefertigt. Hierzu wurden je 1, 2, 3, und 6 µl des Transkriptionsansatzes auf einem kleinen Polyacrylamid-Gel (6% PAA, 8M Harnstoff) aufgetrennt. Bei einem passenden Ergebnis wurde der Ansatz der Transkription über Nacht angesetzt.

Tabelle 5.29: Ansatz der Testtranskription und Transkription

Reagenz	Testtranskription	Transkription
Plasmid (linearisiert, 1 µg bzw. 100 µg)	x µl	x µl
MQ	x µl	x µl
250 mM MgAc2	10 µl	100 µl
1 M Tris-Cl, pH8	20 µl	200 µl
1 M DTT	2 µl	20 µl
200 mM Spermidin	1 µl	10 µl
100 mM ATP	4 µl	40 µl
100 mM CTP	4 µl	40 µl
100 mM GTP	4 µl	40 µl
100 mM UTP	4 µl	40 µl
RiboLock	5 µl	5 µl
T7-Polymerase	0,3 µl	3 µl
	100 µl	1000 µl
	1 h, 37°C	ÜN, 37°C

Am nächsten Tag wurde 1 µl des Transkriptionsansatzes für ein Kontrollgel zurückbehalten, der Rest des Ansatzes wurde sehr gut durchmischt und kurz abzentrifugiert. Das Pyrophosphat fiel aus und sammelte sich im Pellet. Der Pyrophosphat-freie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde mit 500 µl 0,5 M EDTA versetzt, um restliches Phosphat in Lösung zu bringen. Beim anschließenden Fällern sammelte sich nur die RNA im Pellet. Das Fällern wurde mit 10% 3 M Natriumacetat, pH 6,5 und 1 Volumen Isopropanol durchgeführt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Zugabe des EDTA das Gesamtvolumen auf 1,5 ml erhöht hatte. Nach 2 h auf -80°C wurde der Ansatz für 1h bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren (15 min) in 2 ml 1x RNA-Ladepuffer gelöst.

5.12.4.5 UV-Shadowing

Zum Gießen eines denaturierenden Polyacrylamidgels (6% PAA, 8M Harnstoff) wurden Glasplatten verwendet, die auf einer Seite so beschichtet sind, dass sie bei einer Wellenlänge von 254 nm das eingestrahlte Licht reflektieren. Die reflektierende Seite wurde beim Zusammenbau der Glasplatten zum PAA-Gel hin orientiert. Nachdem der Blaumarker der Proben bis etwa zu ¾ in das PAA-Gel eingelaufen war, wurden die Glasplatten auseinander gebaut, das PAA-Gel blieb dabei auf der reflektierenden Seite der Glasplatte liegen. Mit einer UV-Handlampe (NU-6 KL UV-Handlampe) wurde das PAA-Gel mit 254 nm belichtet und die, das UV-Licht absorbierende, RNA sichtbar gemacht. Sie wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die zerkleinerten Gel-

Fragmente in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Werden mehrere RNAs ausgeschnitten, ist das Skalpell zwischen den einzelnen Vorgängen gründlich zu reinigen.

5.12.4.6 Elution aus dem Polyacrylamidgel

Die Gel-Fragmente wurden im 50 ml Reaktionsgefäß mit 20 ml 300 mM Natriumacetat bedeckt. Die Elution erfolgte über Nacht bei 4°C im Labnet™ Revolver. Am nächsten Tag wurde das Eluat durch einen Sterilfilter (Filtropur 0,45µm) vom aufgelösten Polyacrylamid getrennt. Der gefilterte Überstand wurde über Nacht mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol-Aceton-Gemisch (1:1) bei -20°C gefällt. Nach 1 h bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und nach dem Trocknen in 200 µl MQ aufgenommen. Ein Kontrollgel (6% PAA, 8 M Harnstoff) wurde mit einem 1 µl der aufgereinigten Transkription durchgeführt.

5.12.4.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Ein EMSA dient der Überprüfung von DNA-Protein-Interaktionen. Es werden Proteine mit einer bekannten DNA-Sequenz inkubiert, um eine Interaktion der beiden potentiellen Bindungspartner sichtbar zu machen. Wenn sich aus den Interaktionspartnern ein Komplex bildet, verändert dies dessen Laufeigenschaften im Gel, und anhand des Versatzes der Banden wird die Interaktion sichtbar. Auch für RNA-RNA- oder RNA-Protein-Interaktionen ist diese Nachweismethode gebräuchlich. Es wurden die radioaktiv markierte und nicht-markierte RNA 1 vermischt und schließlich mit dem potentiellen Interaktionspartner einer nicht radioaktiv markierten RNA 2 versetzt (Tab. 5.30).

Tabelle 5.30: Mischungsverhältnis von radioaktiv markierter und unmarkierter RNA im EMSA

Reagenz	Menge
RNA 1	0,5 µM
RNA1- ³² P	50.000 cpm
RNA 2	10x oder 20x Überschuss
Σ	10µl

Die RNAs wurden 1 min bei 96°C zusammen denaturiert und 5 min im Eiswasserbad abgekühlt. Dann wurden sie mit 1 µl 10x Strukturpuffer versetzt und 15 min bei 28°C inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mitgeführt, in der nur RNA 1 (radioaktiv markierte und nicht-markierte) enthalten ist, aber der potentielle Interaktionspartner fehlte. Das Auftragen auf das Gel erfolgte bei angelegten 300 V. Die freien Geltaschen wurden mit 1x nativem Ladepuffer beladen. Der EMSA wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt und lief bei 300 V etwa 3 h. Als das Bromphenolblau des Ladepuffers etwa ¾ der Lauffront des Gels erreicht hatte, wurde es aus der Apparatur entnommen und auseinandergebaut. Die leeren Seiten des Gels wurden abgeschnitten, das Gel selbst auf einen kleinen Stapel aus 4-5 Whatman-Papieren überführt. Es wurde mit einer Lage Folie abgedeckt, die Ränder der Folie wurden am Whatman-Papier festgeklebt. Das Gel wurde mit der Papierseite nach unten auf den Gelrockner gelegt und für 30 min bei 80°C getrocknet. Nach weiteren 15 min Abkühlzeit wurde das Vakuum vorsichtig gelöst. Das Gel wurde auf einen Phospho Storage Screen aufgelegt, das Signal am nächsten Tag ausgelesen.

Zum Ausschluss von unspezifischen Interaktionen kann Hefe-tRNA bei der Reaktion mitgeführt werden. Sie sollte in parallel mitgeführten Ansätzen im gleichen Verhältnis wie RNA 2 zusätzlich zur Reaktion zugegeben werden.

5.12.4.8 cDNA-Synthese

Um weitere Untersuchungsmöglichkeiten für RNA auszuschöpfen zu können, muss diese in DNA geschrieben werden. Hierzu wurde die SuperScript® IV Reverse Transcriptase verwendet. Zunächst wurden die gewählten Oligonukleotide (Random Hexamere, Invitrogen oder spezifische Sequenzen, Sigma Aldrich) an die eingesetzte RNA annealed (Tab. 5.31).

Tabelle 5.31: Annealing der verwendeten Oligonukleotide an die RNA

Reagenz	Menge
Random Hexamere [50 µM] oder spezifische Oligonukleotide [2 µM]	1 µl
dNTPs [10 mM each]	1 µl
RNA [10 pg- 5 µg total RNA]	1 µl
MQ	10 µl
Σ	13 µl

Der Annealing-Ansatz der verwendeten Oligonukleotide mit der umzuschreibenden RNA wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und dann für 15 min auf Eis gekühlt (vorgeschrieben sind in diesem Schritt mindestens 5 min). Im Anschluss wurde der Annealing-Ansatz mit dem Reaktions-Mastermix gemischt (Tab. 5.32).

Tabelle 5.32: Reaktions-Mastermix der cDNA-Synthese mit SuperScript® IV Reverse Transcriptase

Reagenz	Menge
SuperScript® IV Puffer	4 µl
DTT [100 mM]	1 µl
Ribolock	1 µl
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	1 µl
Σ	7 µl

Basierend auf den für die Reaktion verwendeten Oligonukleotiden wurde nachfolgend die Inkubation des gesamten Reaktionsansatzes durchgeführt. Es wurden Random Hexamer-Oligonukleotide verwendet, weshalb ein zusätzlicher Inkubationsschritt von 10 min bei 23°C durchgeführt wurde (Tab. 5.33). Bei spezifischen Oligonukleotiden kann dieser Schritt weggelassen werden.

Tabelle 5.33: Inkubationszeiten der cDNA-Synthese mit der SuperScript® IV Reversen Transcriptase

	Random Hexamere	spezifische Oligos
	23 °C, 10 min	
Inkubationszeiten	55°C, 10 min	55°C, 10 min
	80°C, 10 min	80°C, 10 min

Von der cDNA-Synthese wurden 2 µl für deren Überprüfung in eine RT-PCR eingesetzt. Die Hälfte des cDNA-Ansatzes wurde 1:10 verdünnt und als Matrize für eine Quantitative *real-time* PCR verwendet.

5.12.4.9 RT-PCR

Die RNA wurde mit der SuperScript® IV Reversen Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Die Qualität dieser DNA wurde anschließend mittels RT-PCR überprüft. Der Ansatz der RT-PCR ist

Tabelle 5.34 zu entnehmen. Die Reagenzien der RT-PCR wurden zusammen pipettiert und dem gleichen PCR-Programm unterzogen, welches auch zur Kolonie-PCR verwendet wurde. Die Zyklen-Anzahl des RT-PCR-Programmes wurde jedoch auf 35 Zyklen angehoben.

Tabelle 5.34: Reaktionsansatz RT-PCR

Reagenz	Menge
cDNA	2 µl
Oligonukleotid_fwd [10 µM]	1 µl
Oligonukleotid_rev [10 µM]	1 µl
dNTP [10 µM]	1 µl
10x ThermoPol Puffer	5 µl
MQ	39 µl
Taq-Polymerase (New England Biolabs, USA)	1 µl
Σ	50 µl

5.12.4.10 Quantitative *real-time* PCR

Für eine quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde cDNA verwendet, die zuvor mit der SuperScript® IV Reverse Transcriptase synthetisiert und 1:10 verdünnt wurde (Tab. 5.35). Die für die qPCR benötigten Reagenzien wurden in oben aufgeführter Reihenfolge in eine 96 Well Platte (MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) pipettiert. Für jedes zu überprüfende Gen und Referenzgen wurden die entsprechenden Oligonukleotidpaare in eigenen Ansätzen pipettiert. Als Kontrollen wurden für jedes Oligonukleotidpaar Ansätze mit MQ und RNA als Matrize mitgeführt. Als Referenz für die qRT-PCR in *S. coelicolor* diente *hrdB*, ein Sigmafaktor der häufig als Referenz in qRT-PCR-Reaktionen herangezogen wird. (Borodina *et al.*, 2008; D'Alia *et al.*, 2010)

Tabelle 5.35: Reaktionsansatz qRT-PCR

Reagenz	Menge
Oligonukleotid_fwd [10 µM]	1 µl
Oligonukleotid_rev [10 µM]	1 µl
MQ	4 µl
cDNA (1:10) oder RNA oder MQ	4 µl
SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Σ	20 µl

Die Elongationszeit der PCR (in Phase 2) wurde an die Länge der zu amplifizierenden Sequenz angepasst. Bei einer qPCR wird mit etwa 1 kb pro Minute gerechnet (Abb. 5.1).

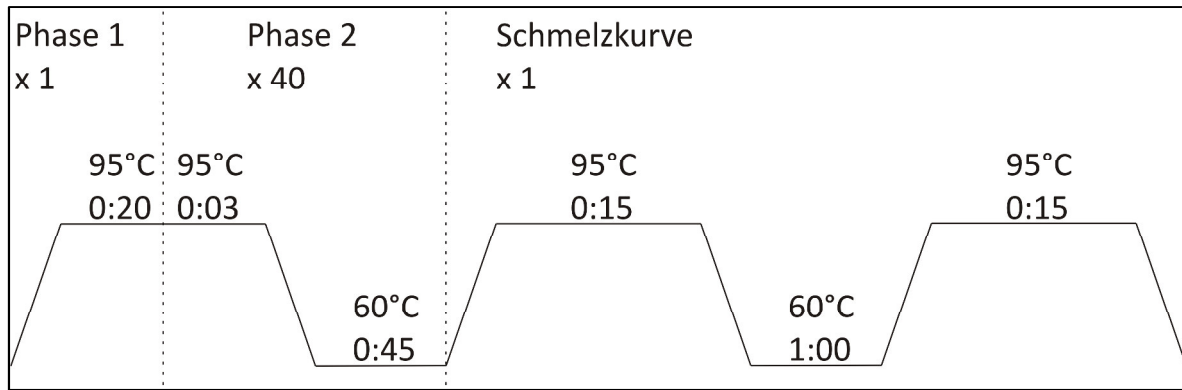


Abbildung 5.1: Programm der quantitativen *real-time* PCR.

Aufgezeigt sind Temperatur, Zyklanzahl der einzelnen Phasen und Zeitpunkt sowie Art der Aufzeichnung der Schmelzkurve.

5.12.5 Protein-spezifische Methoden

5.12.5.1 Proteinextraktion aus *S. coelicolor*

Für die Proteinextraktion wurden Streptomyceten einer Flüssigkultur oder von Festmedium wie für die RNA-Extraktion (Kapitel 5.13.3.9) geerntet. Während des Ernteprozesses wurden die Zellpellets mit einem Volumen 1x ZAP gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden mit einem Spatel in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese enthielten bereits je 200 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm). Es wurden 400 µl 1x ZAP hinzugefügt und die Zellen acht Mal für 30 s bei 6 m/s in der Fastprep® aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurden die Zellen 5 min auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden für 30 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

5.12.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der präparierte Proteinrohextrakt wurde mit MQ 1:10 verdünnt. 5 µl der Verdünnung wurden in Triplikaten in 96-Well Platten (96 Well Microplates, Greiner) vorgelegt. 155 µl MQ und 40 µl Bradford-Reagenz pro Well wurden als Mastermix vorbereitet und zum Rohextrakt pipettiert. Die Lösungen wurden gründlich gemischt. Als Referenzwert wurde eine Probe mit 5 µl MQ mitgeführt. Die OD_{595} wurde im Tecan-Reader (Infinite M200 Fluoreszenz Plattenleser, Tecan Trading AG) ausgelesen. Sie sollte zwischen 0,2 und 0,8 liegen. Über die Geradengleichung der Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration berechnet (mg/ml). Im Anschluss wurde die Konzentration der Proben eingestellt, diese aliquotiert und bei -20°C gelagert.

$$\text{Menge des einzusetzenden Rohextrakts} = \frac{\text{Wunschkonzentration} \cdot \text{gewünschtes Volumen}}{\text{aktuelle Konzentration}}$$

Die Menge des einzusetzenden Rohextrakts wurde auf 750 µl mit 1x ZAP aufgefüllt und mit 250 µl 4x PAB aufgefüllt. Die Probe wurde 10 min bei 96°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu je 300 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Proteinproben sollten maximal ein- bis zweimal aufgetaut und wieder eingefroren werden.

5.12.5.3 Proteingel nach Schagger

Der Proteingel-Mix wird immer frisch angesetzt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei aufrecht stehende, abgeklebte Glasplatten (20x20 cm) gegossen, sodass es ca. 2 cm unterhalb des

Kammes endete. Der Trenngel-Mix wurde 2-3 mm mit Isopropanol überschichtet. Als das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, Reste davon mit Whatman-Papier aufgenommen. Frischer Proteingel-Mix für das Sammelgel wurde angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Der Kamm wurde luftblasenfrei und möglichst zügig eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine kühlbare Gelkammer (Protean® II xi Cell, BioRad) gespannt. Die Kammer wurde mit 1x Kathodenpuffer (oben) und 1x Anodenpuffer (unten) befüllt. Das Gel lief etwa 16 Stunden bei 40-100 mA und 4°C.

5.12.5.4 Proteingel mit Mini-Protean® TGX™ Precast Gels

Die bei Biorad gekauften, vorgegossenen Gele (Mini-Protean® TGX™ Precast Gels) wurden in die entsprechende Gelkammer (Mini-Protean® Tetra Cell, Biorad) eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x Laemmli-Laufpuffer. Pro Spur wurden je 10 µg der aliquotierten Proteinrohextrakte aufgetragen. Als Marker wurde der Precision Plus Protein All Blue Standards von Biorad verwendet. Nach etwa 45 min bei 150 V konnten die Proteine mittels Silber- oder Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden.

5.12.5.5 Silberfärbung

Das fertige Proteingel wurde in eine Schale mit Deckel gelegt und 1 h bis über Nacht in Fixierungslösung geschwenkt. Danach wurde das Gel 3x 20 min in 50% Ethanol gewaschen, für 1 min mit Lösung 1 inkubiert und anschließend 3x 20 s in MQ gewaschen. Dann wurde es für 20 min in Lösung 2 inkubiert und wieder für 3x 20 s mit MQ gewaschen. Ab Lösung 2 wurden alle genutzten Flüssigkeiten im Sondermüll entsorgt. Es folgte das Entwickeln des Gels mit Lösung 3, so lange bis die Banden sichtbar waren. Als die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100% Essigsäure gestoppt. Das Gel wurde in MQ gekühlt gelagert.

5.12.5.6 Coomassiefärbung

Das fertig gelaufene Proteingel wurde 2 h bis über Nacht in der Fixierungslösung geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Fixierungslösung verworfen, das Gel kurz in MQ gewaschen und anschließend 1h bis über Nacht in Colloidal Coomassie Färbelösung inkubiert. Je länger das Gel in Färbelösung inkubiert wurde, desto intensiver wird die Färbung. Als die Färbung abgeschlossen war, wurde die überschüssige Farbe mit MQ ausgewaschen. Der Entfärbeprozess musste einige Male durchgeführt werden, bis das gewünschte Ergebnis erzielt war.

5.12.5.7 Massenspektrometrie

Proteinbanden aus einem PAA-Gel können massenspektrometrisch analysiert werden, um die aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Hierzu wurde die Gelbande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in einem sterilen Reaktionsgefäß in MQ kühl gelagert. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden einer auf Massenspektrometrie spezialisierten Facility, Proteome Center Tübingen, zur Analyse überlassen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Tabelle 6.1: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp^R	Ampicillin Resistenz
Apr	Apramycin
Apr^R	Apramycin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
asRNA	<i>antisense</i> RNA
ATP	Adenosintriphosphat
Bal	<i>balanced</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	zirka
CAA	Casaminsäuren
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
CIP	Calf Intestine Phosphatase
Cm	Chloramphenicol
Cm^R	Chloramphenicol Resistenz
d	day/ days (engl.: Tag/ Tage)
del	Deletion
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: "und andere")
EtOH	Ethanol
fwd	<i>forward</i> (engl.: "vorwärts")
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
IGR	intergene Region
Km	Kanamycin
Km^R	Kanamycin Resistenz
LB	Luria Broth
<i>loop</i>	Schleife am Ende eines RNA-Stammes
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanolsulfonsäure

MQ	Reinstwasser (durch Millipore-Filter gefiltertes VE- Wasser)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
miRNA	<i>micro</i> RNA
N	Stickstoff
NaAc	Natriumacetat
Nal^R	Nalidixinsäure Resistenz
Nal	Nalidixinsäure
NTP	Nukleotidtriphosphat
oe	Überexpression
oD600	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PNG	4-Nitrophenyl β-D-Glucuronid
PNK	Polynukleotidkinase
P_{Pi}	anorganisches Pyrophosphat
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RBS	Ribosomenbindestelle
rev	reverse (engl.: "rückwärts")
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rRNA	ribosomale RNA
RSS	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>scr</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> RNA
SD	Shine Dalgarno Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Soja-Mannitol
sRNA	<i>small non-coding</i> RNA (engl.: "kleine, nicht-kodierende" RNA)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T_M	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
Trp	Tryptophan
TS	Thiostrepton
TS^R	Thiostrepton Resistenz
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität (1 U = μmol Substratum- setzung*min ⁻¹ ; Bei Restriktionsenzymen: 1 U schneidet 1 μg Referenz-DNA in 1 h bei 37°C)
ÜN	über Nacht

ÜNK	Über-Nacht-Kultur
ÜS	Überstand
ÜTK	Über-Tag-Kultur
UTR	<i>untranslated region</i> (engl.: „nicht translatierte Region“)
UV	ultraviolett
VE	voll entsalzt
v.l.n.r.	von links nach rechts
Vol.	Volumen
ZAP	Zellaufschlusspuffer
z.B.	zum Beispiel
3'-Ende	3'-OH-Ende von Nukleinsäuren
5'-Ende	5'-Phosphat-Ende von Nukleinsäuren

Tabelle 6.2: Nukleobasen

Nukleobasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

6.2 Einheiten und Dimensionen

Tabelle 6.3: Einheiten

Einheit	Bedeutung
A	Ampere
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cpm	<i>counts per minute</i>
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mol	Stoffmenge (6,022*10 ²³ Teilchen)
m	Meter
nt	Nukleotid(e)
rpm	<i>rotations per minute</i>
s	Sekunde
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Watt (1W = 1V*1A)
w/v	<i>weight per volume</i>

Tabelle 6.4: Dimensionen

Vorsätze für Maßeinheiten		
G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
p	Piko	10^{-12}

6.3 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

6.3.1 Sekundärstrukturen der sRNAs

Die in Kapitel 3.2.2 angegebenen Sekundärstrukturen sind Näherungen der Programme *RNAfold* und *mfold* an die tatsächliche Faltung der sRNA-Sequenz [H4, H7]. Berechnet wird die minimale freie Energie der Basenpaarungen. Je länger eine RNA ist, desto schwieriger wird die korrekte Bestimmung der Faltung. Nachfolgend sind die Sekundärstrukturvorhersagen der sieben bearbeiteten sRNAs aufgeführt.

Die in der Northern Blot-Analyse verwendeten Oligonukleotidsonden sind in der Struktur grau unterlegt.

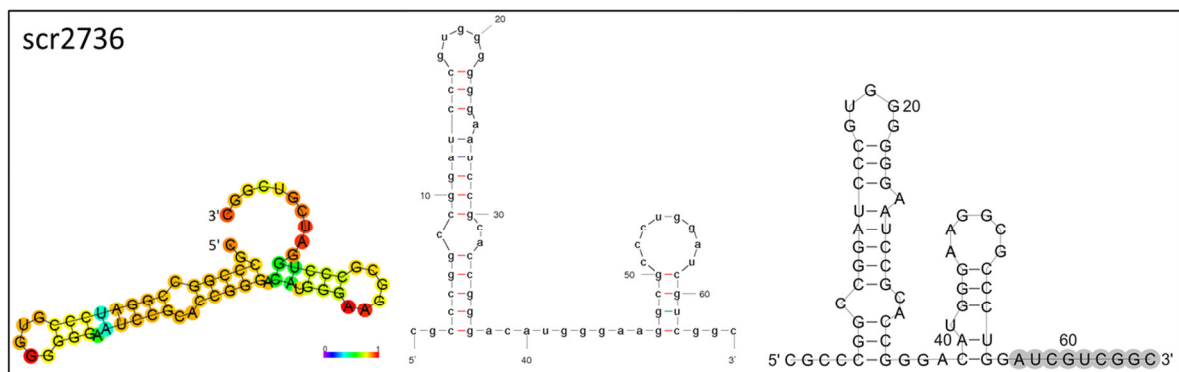


Abbildung 6.1: Sekundärstrukturen der sRNA scr2736

Die Vorhersage der Software *RNAfold* (links) zeigt die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarungen in einem Farbschema von 0 (lila, unwahrscheinlich) bis 1 (rot, wahrscheinlich). Die Struktur in der Mitte wurde durch das Programm *mfold* berechnet. Die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarungen der Sequenz nimmt von lila (0) bis rot (1) zu. Die Faltung der sRNA-Sequenz ergab die Ausbildung von zwei in *loops* endenden Stammschleifen (rechts). Die Bindestelle für die Northern Blot-Sonde S_2736_3 in grau hinterlegt.

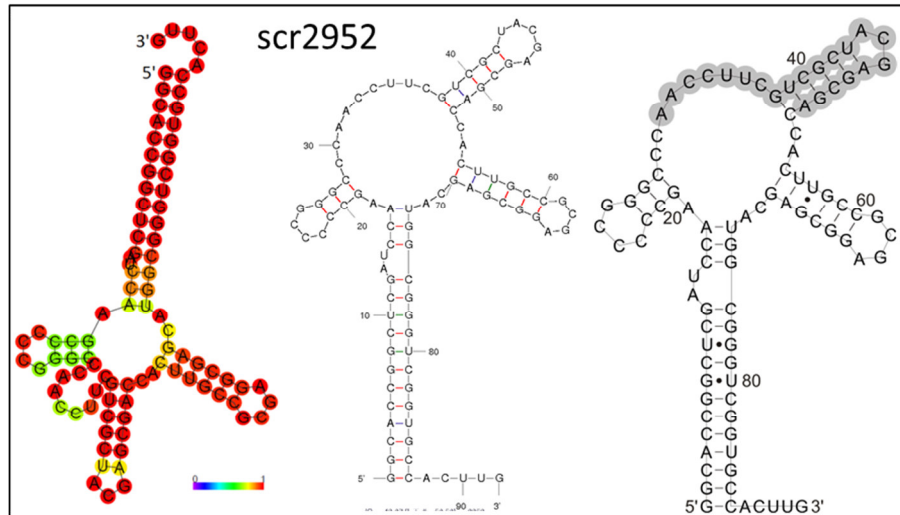


Abbildung 6.2: Sekundärstrukturvorhersage der sRNA scr2952

Die Sekundärstrukturen der sRNA scr2952 wurden mit *RNAfold* (links) und *mfold* (rechts) erstellt. Die Wahrscheinlichkeiten der Basenpaarungen sind der Farbskala von 0 (lila) bis 1 (rot) zu entnehmen. scr2952 bildet drei Stammschleifen aus, die von einem *closing stem* abgehen (rechts). Die Bindestelle der für die Northern Blot-Analysen genutzten Oligonukleotidsonde scr2952 ist grau unterlegt.

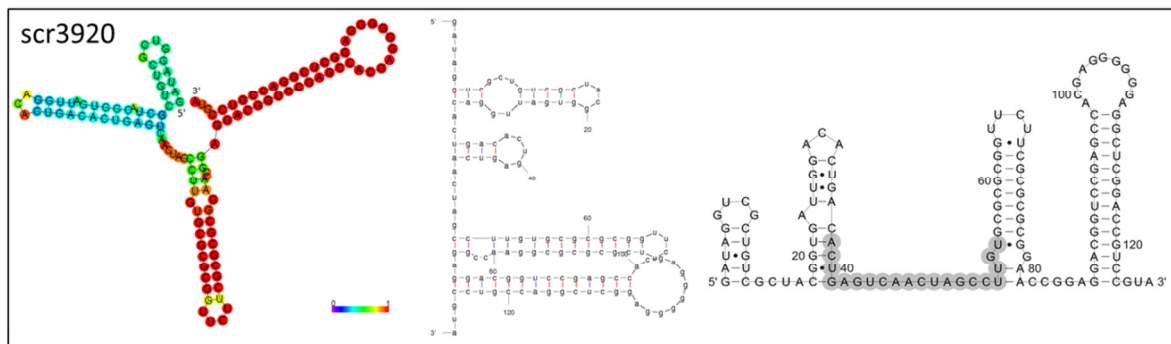


Abbildung 6.3: Strukturvorhersagen der sRNA scr3920

Die Vorhersage der Software *RNAfold* (links) und die durch *mfold* vorhergesagte Struktur (Mitte) zeigen je vier Stammschleifen. In die kombinierte Struktur (rechts) ist das Oligonukleotid S_3920 der Northern Blot-Analyse in grau eingezeichnet.

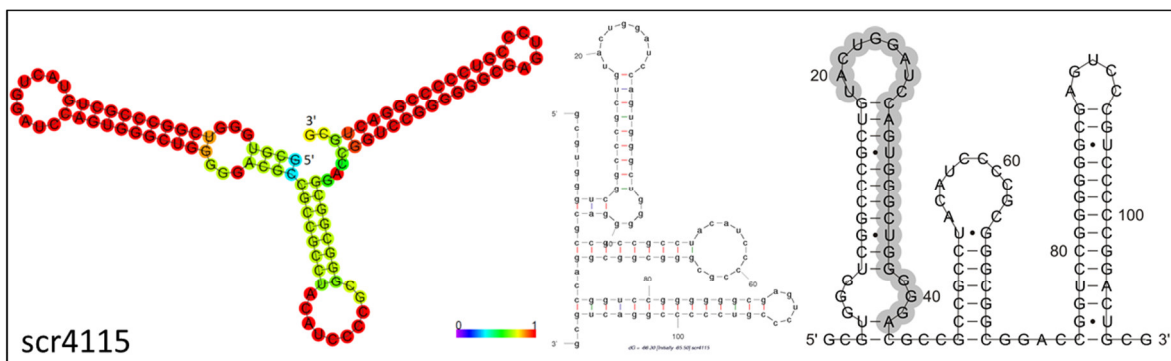


Abbildung 6.4: Faltungsvorhersagen der sRNA scr4115

Die Programme *RNAfold* (links) und *mfold* (Mitte) sagen für die sRNA scr4115 jeweils drei Stammschleifen vorher. Die kombinierte Sequenz der sRNA scr4115 teilt sich in drei Stammschleifen mit nur wenigen ausgewölbten Basen auf. Der Bindebereich des Oligonukleotids S_4115 zur Verwendung als Northern Blot-Sonde ist grau unterlegt.

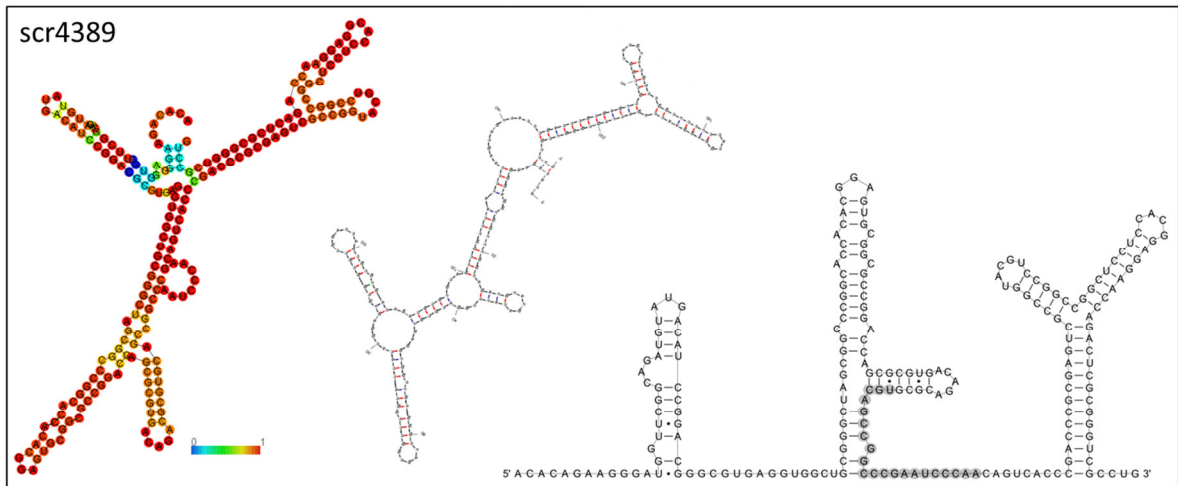


Abbildung 6.5: Sekundärstruktur der sRNA scr4389

Die Struktur der Vorhersage von scr4389 von *RNAfold* (links), *mfold* (rechts) und die Kombination der Strukturvorhersagen (rechts) zeigt mehrere lange Stammschleifen und *loops*. Die Bindestelle der Oligonukleotidsonde S_4389 der Northern Blot-Analyse ist grau eingezeichnet.

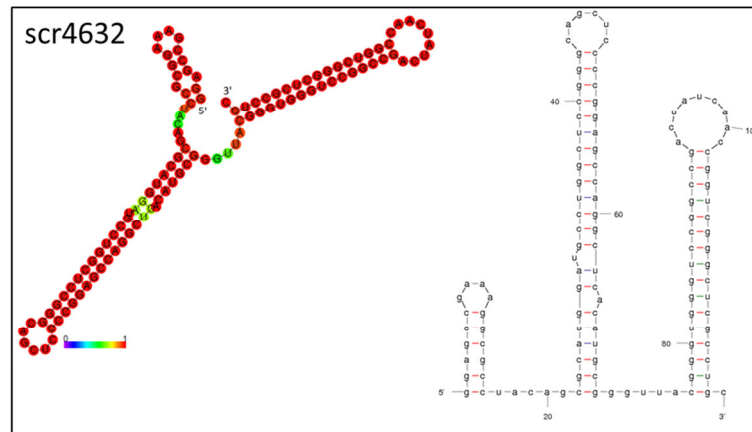


Abbildung 6.6: Sekundärstruktur der sRNA scr4632

scr4632 bildet drei Stammschleifen aus. Die Vorhersage der Sekundärstruktur wurde von *RNAfold* (links) und *mfold* (rechts) berechnet.

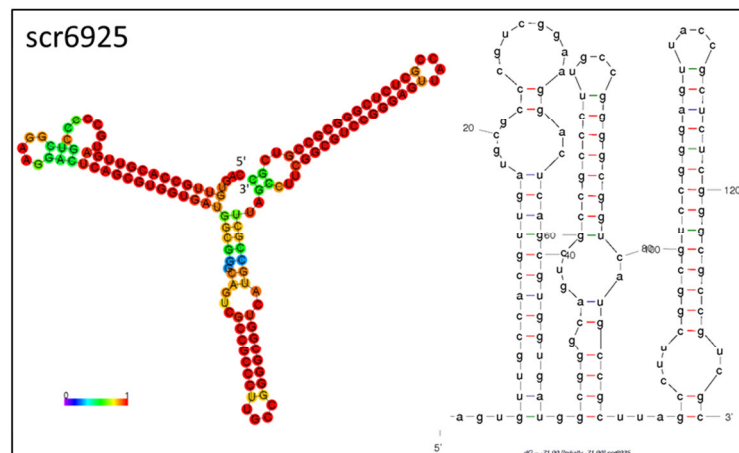


Abbildung 6.7: Strukturvorhersage der sRNA scr6925

Die Vorhersage der Software *RNAfold* (links) und *mfold* (rechts) stimmen für die Sequenz der sRNA scr6925 mit drei ausgebildeten Stammschleifen überein.

6.3.2 Konservierung der sRNAs in der Gattung *Streptomyces*

Die Konservierung der sieben untersuchten sRNAs wurde überprüft. Folgend sind die mit ClustalOmega erstellten Alignments der Konservierung der Sequenzen dargestellt [H2]. Die *loop*-Regionen der Sekundärstrukturen sind eingezeichnet. Da scr4632 nur in *S. coelicolor* gefunden wurde, gibt es für diese sRNA kein Alignment. scr2952 ist die einzige sRNA, die bei einer weiter gefassten Suche auch in einem Bakterium der Gattung *Kitasatospora* gefunden wurde. Diese Gattung gehört wie *Streptomyces* in die Familie der *Streptomycetaceae*.

	scr2736
<i>Streptomyces</i> ...	
albus-DSM-41398	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGAA-TCCGGACATGGAAAGC-GCCCGGAT-CGCCGGC----
albus-J1074	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGACACAGAAAGC-GCC-----
albulus-NK660	CGCCCGG-ACGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACACGGAAAG-CGCC-----
albulus-ZPM	CGCCCGG-ACGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACACGGAAAG-CGCC-----
ambofaciens-ATCC-23877	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGTTCGTCGGC----
avermitilis-MA-4680	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGTA--CGGGACAGGAAG-CGCC-----
bingchengensis-BCW-1	--CCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGTAACCGG--AATGAAGC-GCCC-----
<i>coelicolor</i>	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGAATCGTCGGC----
collinus-Tu-365	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
cyanogriseus-NMUT1	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CG-----
davawensis-JCM-4913	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGA-CGTCGGC----
fulvissimus-DSM-40593	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTGA-CGCTC-----
glaucescens-GLA.0	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
griseus-NBRC-13350	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTGA-CGCTC-----
hygroscopicus-5008	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
hygroscopicus-TL01	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
incarnatus-NRRL-8089	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
leuvenhoekii-sleC34	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
lividans-TK24	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCAC--CGGGACAGGAAGC-GCCC-----
lydicus-A02	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGCA-CGTCGGC----
nodosus-ATCC-14899	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTG-----
pratensis-ATCC-33331	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTG-----
pristinacspiralis-HCCB-10218	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCTGTCGGGGATATGGAAAG-CGCC-----
rapamycinus-NRRL-5491	--CCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGACAGGAAG-CGCC-----
scabies-87.22	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGCT-CGCCGGCTCGGC
spec-769	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAG-CGCC-----
spec-CCM-MD2014	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAG-CGCC-----
spec-CFMR-7	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAG-CGCC-----
spec-Mg-1	--CCCGGTCGGGTCGTGGGGGGAATCCGCTC-CGGGA-AATGAAGC-GCCC-----
spec-PAMC26508	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTG-----
spec-PBH53	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGGT-CGTCGGC----
spec-SirexAA-E	CGCCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGATATGGAAAG-CGCCCTG-----
venezuelae-ATCC-10712	CGCCCGGCGCGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCCTGCT-CGTCG-----
vietnamensis-GIM4.0001	CGCCCGGCGCGGATCCGTGGGGGGAATCCGCA--CGGGACATGGAAAGC-GCCC-----
violaceusinger-Tu-4113	--CCCGG-CGGGATCCGTGGGGGGAATCCGCT--CGGGGACAGGAAG-CGCC-----

Abb. 6.8: Konservierung der sRNA scr2736

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar.

<i>Streptomyces...</i>	scr2952
albus-DSM-41398	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
albus-J1074	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
albulus-NK660	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
albulus-ZPM	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
ambofaciens-ATCC-23877	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
avermitilis-MA-4680	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
bingchengensis-BCW-1	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
cattleya-DSM-46488	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
cattleya-NRRL-8057	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
<i>coelicolor</i>	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
collinus-Tu-365	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
cyanogriseus-NMUT1	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
davawensis-JCM-4913	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
fulvisimus-DSM-40593	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
glaucescens-GLA.0	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
griseus-NBRC-13350	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
hygroscopicus-5008	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
hygroscopicus-TL01	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
incarnatus-NRRL-8089	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
iranensis	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
leuvenhoekii-slec34	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
lividans-TK24	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
lydicus-A02	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
nodosus-ATCC-14899	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
pratensis-ATCC-33331	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
rapamycinus-NRRL-5491	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
pristinacspiralis-HCCB-10218	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
scabiei-87.22	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
sp.-769	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-CCM-MD2014	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-CFMR-7	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-CNQ-509	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-Mg-1	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-PAMC26508	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-PBH53	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
spec-SirexRA-E	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
venezuelae-ATCC-10712	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
vietnamsensis-GIM4.0001	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
violaceusinger-Tu-4113	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
xiamenensis-318	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---
↑ Kitasatospora-seate-KM-6054	GGACCCGGCTCGATCCAAAGCCGCCGCCCCAACCTTCGTCGCTACGAGGACACCACTTGCACCGAGAGCATGGCGGCCCGGTGTCAC---

Abb. 6.9: Konservierung der sRNA scr2952

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar. Die große, die drei inneren Markierungen umfassende, Box stellt den *closing stem* der Sekundärstruktur von scr2952 dar. Diese sRNA wurde als einzige auch außerhalb der Gattung *Streptomyces* in *Kitasatospora seate* identifiziert (Pfeil).

<i>Streptomyces...</i>		<i>scr3920</i>
albus-J1074	GATAGGTCGCTGCTGCCACAGTGATTGGACACTGACGCAGGGTCAACTAGCCTGGACAGG	60
ambofaciens-ATCC-23877	GATAGGTCGCTGTGCTTACCGTGATTGGACACTGACACAGAGTCAACTAGCCTTAATCGC	60
avermitilis-MA-4680	GATAGGTCCTGTGCTGCTACTGTGATTGGACACTGACACAGAGTCAACTAGCCTTGGTCGC	60
bingchengensis-BCW-1	GATAGGCCCATGTGCTGCTACTGTGATTGGACACTGACGCTGAGTCAACTAGCCTTGTTCGA	60
cattleya-DSM-46488	GATAGCTCGTCGGTCCAACGTGTGATTGGACACTGACGCAGAGTCAACTAGCCTTGTTCAT	60
cattleya-NRRL-8057	GATAGCTCGTCGGTCCAACGTGTGATTGGACACTGACGCAGAGTCAACTAGCCTTGTTCAT	60
coelicolor	GATAGGTCGCTGTGCTGCTACGGTGATTGGACACTGACACTGAGTCAACTAGCCTTGTGCGC	60
collinus-Tu-365	GATAGGTCCTGTGCTGCTAGCGTGATTGGACACTGACAGACAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
cyanogriseus-NMWT1	GATAGGTCCTGTGCTGCTACCGTGATTGGACACTGACACAGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
davawensis-JCM-4913	GATAGGTCCTGTGCTGCTACTGTGATTGGACACTGACACAGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
glaucescens-GLA.0	-----GTGATGGACACTGACAG-CACTCAACTCGCCTTGCCAGT	39
hygroscopicus-TL01	GATAGGTCCTGTGCTTACGCTGATTGGACACTGACGCAGAGTCAACTAGCCTGGTTCGC	60
hygroscopicus-5008	GATAGGTCCTGTGCTTACGCTGATTGGACACTGACGCAGAGTCAACTAGCCTGGTTCGC	60
incarnatus-NRRL-8089	GATAGGTCCTGTGCTGCTAGCGTGATTGGACACTGACAGAGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
leuvenhoekii-sleC34	GATAGGTCCTGTGCTGCTACCGTGATTGGACACTGACACACAGTCAATTAGCCTTGTTCGC	60
lividans-TK24	GATAGGTCGCTGTGCTGCTACCGTGATTGGACACTGACACTGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
nodosus-ATCC-14899	GATAGGTCCTGTGCTTACAGTGATTGGACACTGACAAAGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
pratensis-ATCC-33331	GATAGCTGGCTGTGCTTACTGTGATTGGACACTGACGCACAGTCAATTAGCCTTGTTCAG	60
pristinaespiralis-HCCB-10218	GATAGGTCCTGTGCTGCTAGCGTGATTGGACACTGACGCTGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
rapamycinus-NRRL-5491	GATAGGTCCATGTGCTGCTACTGTGATTGGACACTGACGCTGAGTCAACTAGCCTTGTTCGA	60
scabiei-87.22	GATAGGCCCTGTGCTGCTAGCGTGATTGGACACTGACACAGAGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
spec-CCM-MD2014	GATAGGTCGCTGTGCTGCCCTGTGATTGGACACTGACACTCAGTCAACTAGCCTGGGTCGC	60
spec-Mg-1	GATAGGCCATGTGCTTACCGTGATTGGACTCTGACAGAGGGTCAACTAGCCTTGTTCGC	60
spec-PAMC26508	GATAGCTGGCTGTGCTTACTGTGATTGGACACTGACGCACAGTCAATTAGCCTTGTTCAG	60
spec-PBH53	GATAGGCCCTGTGCTGCTAGCGTGATTGGACACTGACGCAGAGTCAACTAGCCTTGTTCCTC	60
spec-SirexAA-E	GATAGGGAGCTGTGCTTCTGTGATTGGACACTGACGCTCGGTCAACTAGCCTTGTTCAG	60
venezuelae-ATCC-10712	GATAGGTCCTGTGCTGCTACCGTGATTGGACACTGACGCACAGTCAACTAGCCTTGTTCAG	60
vietnamensis-GIM4.0001	GATAGGTCGCTGTGCTGCTACCGTGATTGGACACTGACGCACAGTCAACTAGCCTTGTTCAG	60
violaceusniger-Tu-4113	GATAGGTCCTGTGCTGCTACTGTGATTGGACACTGACGCTGAGTCAACTAGCCTTGTTCGA	60
albus-J1074	ACGGC-TCTTCAGTAC--CGAGCCG-GGGCGGCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	124
ambofaciens-ATCC-23877	GCGGT-TCTTCG-CGCGCAGAACCGAGGAGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	126
avermitilis-MA-4680	GCGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCG--GACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	124
bingchengensis-BCW-1	GCGGT-TCTCCA-TGAGG-GAACC-GGG-CGTCTCAAGCCACGAGGGGGGAGGCT-----	111
cattleya-DSM-46488	CGCGTCGCTTG--CGTACGCGACC---GGTGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTC-----	111
cattleya-NRRL-8057	CGCGTCGCTTG--CGTACGCGACC---GGTGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTC-----	111
coelicolor	GCGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCGAGGAGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT	127
collinus-Tu-365	GCGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCG--GGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	123
cyanogriseus-NMWT1	GCGGT-TCTTCG-CGCGCAGAACCG--GACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	124
davawensis-JCM-4913	GCGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCG-GAGGACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	125
glaucescens-GLA.0	GCGGT-TCTTCG--TGCGCGGACCT---GGGGTCCGAGCCACGAG--GGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	99
hygroscopicus-TL01	ACGGT-CTT--T-CCAGGAAGCCGAGGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCC--	122
hygroscopicus-5008	ACGGT-CTT--T-CCAGGAAGCCGAGGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCC--	122
incarnatus-NRRL-8089	GCGGT-TCTTCGCGCGCAGGAACCGAAGACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCC--	124
leuvenhoekii-sleC34	GCGGT-TCTTCG-CGCGCAGAACCG--GACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	123
lividans-TK24	GCGGT-TCTTCG-CGCGCAGAACCGGAGGAGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT	127
nodosus-ATCC-14899	GCGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCG--GGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	123
pratensis-ATCC-33331	ACGGT-TCTTCG-CGCA-GGAACCG-GGG-CGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGT--	118
pristinaespiralis-HCCB-10218	ACGGT-TCTTCG-CGCGCAGGAGCCGAGGGCGGTCCGAGCCATGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT	126
rapamycinus-NRRL-5491	GCGGT-TCTCCA-CGAGGAGAACCG-GGG-CGTCTCAAGCCACGAGGGGGGAGGCT-----	112
scabiei-87.22	GCGGT-TCTTCG-TGCGCGGAACCG-GGGGACGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	125
spec-CCM-MD2014	GCGGT-TCTTCG-CGCGTTGAACCGGAG--GGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	123
spec-Mg-1	GTGGT-TCTTCG-CGCGCGGAACCG-GGGCGGTCCGAGCCACTAGGGGGGAGGCTCGGTCGCCGT-	125
spec-PAMC26508	ACGGT-TCTTCG-CGCA-GGAACCG-GGG-CGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGT--	118
spec-PBH53	GCGGC-ATTCT-CCCGCGAAGCCGAGGCGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	125
spec-SirexAA-E	ACGGT-TGCTCG-TGCGAGGAACCG--GGGTGGTCCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCATCCGT-	124
venezuelae-ATCC-10712	GCGGT-TCTTCG-CGCGTGAACCG-AGG-CGTTCGAGCCACGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	120
vietnamensis-GIM4.0001	GCGGT-TCTTCG-CGCGTGAACCG-AGGACGTTCGAGCCATGAGGGGGGAGGCTCGGCCGTCCGT-	122
violaceusniger-Tu-4113	GCGGT-TCTCCA-CGAGAGAACCG-GGG-CGTCTCAAGCCACGAGGGGGGAGGCT-----	112

Abb. 6.10: Konservierung der sRNA scr3920

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar.

		scr4115
<i>Streptomyces...</i>		
albus-DSM-41398	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGGTCAGCGGGCTGGGGGAACACCCGCCGCTCC-CATCCCCGCG	
albulus-NK660	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTC-ATCCCCCGCG	
albulus-ZPM	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTC-ATCCCCCGCG	
ambofaciens-ATCC-23877	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
avermitilis-MA-4680	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
bingchenggensis-BCW-1	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACGGAAT-CAGTGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
coelicolor	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
collinus-Tu-365	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGCGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTA-CATCCCCGCG	
cyanogriseus-NMWT1	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
davawensis-JCM-4913	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
fulvissimus-DSM-40593	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-TAC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
glaucescens-GLA.0	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--GACTG--CCGGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
griseus-NBRC-13350	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-AAC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
hygroscopicus-5008	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
hygroscopicus-TL01	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
incarnatus-NRRL-8089	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTT-CATCCCCGCG	
leuvenhoekii-sleC34	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
lividans-TK24	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
lydicus-A02	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-TAC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
nodosus-ATCC-14899	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGCGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
pratensis-ATCC-33331	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGCGGGCTGGGGGA-GAC-CGCCGCTC-AATCCCCGCG	
pristinaespiralis-HCCB-10218	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-AATCCCCGCG	
rapamycinus-NRRL-5491	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
scabiei-87.22	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
spec-769	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTC-ATCCCCCGCG	
spec-CCM-MD2014	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-CATCCCCGCG	
spec-CFMR-7	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--CACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-TAC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
spec-Mg1	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--GCGTTGA-TGGCGGGCTGGGGGA-TGC-CGCCGCTC-AATCCCCGCG	
spec-PBH53	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGTGGGCTGGGGGA-CAC-CGCCACCTT-CATCCCCGCG	
violaceusninger-Tu-4113	GCGTGGGTCGGCCCGCTG--TACTGGATCCAGCGGGCTGGGGGA-CGC-CGCCGCTC-ATCCCCCGCG	
albus-DSM-41398	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGCAGCGGTGCCTCCCGGACTGCG 112	
albulus-NK660	GGTGGCGGTCCGG-TCCGGGAGGCGCAG-CCTCGCTTCCCGGAC---- 105	
albulus-ZPM	GGTGGCGGTCCGG-TCCGGGAGGCGCAG-CCTCGCTTCCCGGAC---- 105	
ambofaciens-ATCC-23877	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGTGTC-CCTCGCTCCCGGACCGCG 109	
avermitilis-MA-4680	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGAAC-TCCGCTCCCGGACTG-- 107	
bingchenggensis-BCW-1	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGAT-GCTCGCTCCCGGACTG-- 106	
coelicolor	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCAGT-CCTCGTCCCGGACTGCG 109	
collinus-Tu-365	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGATG-CCTCGCTCCCGGACTG-- 107	
cyanogriseus-NMWT1	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGTGT-CCTGCTCCCGGAC---- 105	
davawensis-JCM-4913	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCAGT-CCTCGCTCCCGGACTGCG 109	
fulvissimus-DSM-40593	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGTGAGG-CACCTCCCGGACTG-- 107	
glaucescens-GLA.0	GGCGGGCGGTCCGG-CCCGGGGGGCGAGT-CCTGTTTCCCGG----- 101	
griseus-NBRC-13350	GGCGGTGGACCGG-TCCGGGAGGTGAGG-CACCTCCCGGACTG-- 107	
hygroscopicus-5008	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGATG-CCTCGCTCCCGG----- 103	
hygroscopicus-TL01	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGATG-CCTCGCTCCCGG----- 103	
incarnatus-NRRL-8089	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGATG-CCTCGCTCCCGGACTG-- 107	
leuvenhoekii-sleC34	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGTGT-CCTCGCTCCCGGAC---- 105	
lividans-TK24	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCAGT-CCTGTCCTCCCGGACTGCG 109	
lydicus-A02	GGTGACGGTCCGG-TCCGGGAGGCGAAG-CCTGTTCCCGGAC---- 105	
nodosus-ATCC-14899	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCGAAT-TCCGCTCCCGGAC---- 105	
pratensis-ATCC-33331	GGCGGGCGAACCGG-TCCGGGAGGTGAT-GACACCTCCCGGACTG-- 106	
pristinaespiralis-HCCB-10218	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGGAGGCGA----- 92	
rapamycinus-NRRL-5491	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGAAT-GCTCGCTCCCGGACTG-- 107	
scabiei-87.22	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCGAAC-TCCGCTCCCGGACTG-- 107	
spec-769	GGTGGCGGTCCGG-TCCGGGAGGCGCAG-CCTCGCTTCCCGGAC---- 105	
spec-CCM-MD2014	GGCGGGCGGACCGG-CCCGGGGGGCGAGT-CCTGTCCTCCCGG----- 103	
spec-CFMR-7	GGCGGGCGGACCGG-TCCGGGAGGTGAGG-CACCTCCCGGACTG-- 107	
spec-Mg1	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGGGGCGAT-CCTGCTCCCGGACCG- 107	
spec-PBH53	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGATG-CCTCGCTCCCGG----- 103	
violaceusninger-Tu-4113	GGTGGCGGACCGG-TCCGGGAGGCGAAT-GCTCGCTCCCGGACTG-- 107	

Abb. 6.11: Konservierung der sRNA scr4115

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar. Aufgelistet sind die Namen der Arten von *Streptomyces*.

Str. streptomyces...	Str. streptomyces...	scr4389	
		Str. streptomyces...	Str. streptomyces...
albus-J1674	albus-J1674	ACACGAGAGGAGGTGGTTCCGCAGATGATACACATACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGTTTGTGCATCTCCCGCGGTTCCAGCTGAGCGCGGATCCG	120
ambofaciens-ATCC-23877	ambofaciens-ATCC-23877	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGATACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGGCTGCGGCGGACCA	100
avermittilis-MA-4689	avermittilis-MA-4689	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACAAACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCTGCTACACAC	100
coelicolor	coelicolor	ACA-CAGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATGATCATCCGACGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGACGACAC	99
collinus-Tu-365	collinus-Tu-365	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCTGCCACACAC	100
cyanogriseus-NMUT1	cyanogriseus-NMUT1	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCTGCCGCGGACCA	100
dauvensensis-JCM-4913	dauvensensis-JCM-4913	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGACACCC	99
glaucescens-GLA.0	glaucescens-GLA.0	ACAC-CGAAAGGAGAGTGGTTCCGCAGATGATGAAACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGC-CGCTGACAC-C	97
hygroscopicus-5008	hygroscopicus-5008	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	100
hygroscopicus-TL01	hygroscopicus-TL01	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	100
incarnatus-NRRL-8089	incarnatus-NRRL-8089	-----GGAAGTGGTGGTAAATGATGAAACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	90
leuvenhoekii-slec34	leuvenhoekii-slec34	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	100
lividans-TK24	lividans-TK24	ACA-CAGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATGATCATCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGACACAC	99
nodosus-ATCC-14899	nodosus-ATCC-14899	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	100
scabiei-87.22	scabiei-87.22	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATATGACACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCTGACACAC	100
spec-769	spec-769	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATTTGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGC-CGAGAGCTCC	100
spec-CCM-MD2014	spec-CCM-MD2014	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATACGACACCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGACACAC	100
spec-CNO-509	spec-CNO-509	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGAAATGATGAGATACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCTGCCGCTCCG	101
spec-Mg-1	spec-Mg-1	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGAAATGATGAGAAATCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTGCTGAC	104
spec-PBH53	spec-PBH53	ACACGAGAGGAGAGGTGGTTCCGCAGATGATATGAAACCCGAGACGCTGAGGTGACTGCGGCTACGAGCCCGGTACACAC	100
albus-J1674	albus-J1674	GTGCGGGGTTCGGCTCCGACAGCGCGG-CCA-ATCCCG-AGCAGT-CACCCTCGGCCCCGCGAGAC-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCCCGCG	235
ambofaciens-ATCC-23877	ambofaciens-ATCC-23877	GCAGCGG-CGTGATACGTGCGAGCGCGGCCCA-ATCCCA-ACAGT-CACCCAGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	213
avermittilis-MA-4689	avermittilis-MA-4689	GCAGCGTG-ACATGACGCGAGCGCGGCCCA-ATCTCC-ACAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	222
coelicolor	coelicolor	GCAGCGTG-ACAGATACGTGAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	221
collinus-Tu-365	collinus-Tu-365	GCACGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-ACAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	221
cyanogriseus-NMUT1	cyanogriseus-NMUT1	GCACGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCG-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	213
dauvensensis-JCM-4913	dauvensensis-JCM-4913	GTGCGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	218
glaucescens-GLA.0	glaucescens-GLA.0	GCACGCG-ACAGTACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	209
hygroscopicus-5008	hygroscopicus-5008	GCACGCG-ACAGTACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	211
hygroscopicus-TL01	hygroscopicus-TL01	GCAGCGTG-CG-AACAGCAGCAGCGGCTCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	211
incarnatus-NRRL-8089	incarnatus-NRRL-8089	GCAGCGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	199
leuvenhoekii-slec34	leuvenhoekii-slec34	GCAGCGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	214
lividans-TK24	lividans-TK24	GCAGCGTG-ACAGATACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	211
nodosus-ATCC-14899	nodosus-ATCC-14899	GCAGCGG-ACAC-AGCGTACAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	219
scabiei-87.22	scabiei-87.22	GCAGCGG-TC-GHACGTGACAGCGCGGCCCA-ATCTCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	221
spec-769	spec-769	GCAGATACAGAGTACGAGTACGAGCGCGGCCCA-ATCTCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	223
spec-CCM-MD2014	spec-CCM-MD2014	GGGTGCC-ACAGATACGAGTACGAGCGCGGCCCA-ATCTCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	212
spec-CNO-509	spec-CNO-509	GAT-----GCA-CGACGGC--ACCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	211
spec-Mg-1	spec-Mg-1	-----GCG-CCAGGCG--ACCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	213
spec-PBH53	spec-PBH53	GCAGCGG-ACAGATACGAGTACGAGCGCGGCCCA-ATCCCA-AGCAGT-CACCACCGACCCGCGAGAT-CGCCGGTTCGTTCCGGCTCGGCTCGCTG	212

Abb. 6.12: Konservierung der sRNA scr4389

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar.

<i>Streptomyces...</i>		scr6925
albus-DSM-41398	----GTTGCCACGCTGACGTGCCCGTCGCATAAGGGGT	CAGCGTGGTGACGGTGTGCG-
albulus-NK-660	--GTGTTGCCACGTTGAGGTGTCCCGTGC--GAAGGGCT	CAGCGTGGTGATGATGGGCA-
albulus-ZPM	--GTGTTGCCACGCTGAGGTGTCCCGTGC--GAAGGGTT	CAGCGTGGTGATGATGGGCA-
coelicolor	CAGTGTTGCCACGTTGATGCGCCCGTC-G--GAAGGACT	CAGCGTGGTGATGGCGGGCA-
davawensis-JCM-4913	-----GCCTCGTAG--GAAGGACCGGTGCGGTGAAGGTGGGTAA	
leuwenhoekii-sleC34	--GTGTTGCCACGCTGAGACGCCCGGT-G--GAAGGGAT	CAGCGTGGTGATGAG--GCG-
lydicus-A02	-----CCCCTG--GAAGGGCCGGTGCGGTGT-TGTGGGTAA	
scabiei-87.22	CAGTGTTGCCACGCTGACGCGCCCTT-G--GAAGGACT	CAGCGTGGTGATGGTGGGCA-
spec-CCM-MD2014	--GTGTTGCCACGCTGAGACGCCCGT-G--GAAGGGAT	CAGCGTGGTGATGGTGG-CG-
spec-CFMR-7	-----GCCCGTAG--GAAGGTCCGGTGCGGTGAAGGCGGGTG-	
albus-DSM-41398	G--TCCG-CCCTC--CGGGGCG--GGTGCCGC-TCGGCGTCCGGTGTCCGGGAG	
albulus-NK-660	CGATCCG-CTTTAGCCGGG-----TTAGCCGT-TCAGTGATCGGCGTCCGAGAG	
albulus-ZPM	CGATCCG-CTTTAGCCGGG-----TTGGCCGT-TCAGTGATCGGCGTCCGAGAG	
coelicolor	GTCGCCG-CCCTTGCCGGGGCGGTCA-TGCCGC-TTAGCCTTCGGCGTCCGGGAG	
davawensis-JCM-4913	ATCTCCG-CCCTTGCCGGGGCAGGAG-TGCCAT-TTGGCGTTCCGGCGTCCGGGAG	
leuwenhoekii-sleC34	ATATCCG-CCCTTGCCGGGGCGGTGTGAGCCGTTGAAGCGCTCGGCGTTCGGGAG	
lydicus-A02	ATCTCCGGCCCTTGCAAGGGGCGAGGAG-TGCCAT-TTGGCGGTCCGGCGTCCGGGAG	
scabiei-87.22	ATCTCCG-CCCTTGCCGGGGCGGGTA-TGCCGC-TTAGCGTTCCGGCGTCCGTGAG	
spec-CCM-MD2014	ATCTCCG-CCCTTGCCGGGGCGGTAT-AGCCGT-TAAGCGTCCGGCGTCCGGGAG	
spec-CFMR-7	ATCTCCG-CCCTTGCCGGGGCGGGAG-TGCCAT-CAGGCGGTCCGGCGTCCGGGAG	
albus-DSM-41398	TTAC-CGCTC-CCGG----- 114	
albulus-NK-660	TTGC-CGCTC-TCGGGCGCCGTTGC 126	
albulus-ZPM	TTGC-CGCTC-TCGGGCGCCGTCGC 126	
coelicolor	TTAC-CGCTC-TCGGGCGCCGTCGC 131	
davawensis-JCM-4913	TTACC-GCTCCATGGGCGCCGTCGC 114	
leuwenhoekii-sleC34	TTGCACTC-CCGGGCGCCGTCGC 130	
lydicus-A02	TTACA-GCTCCTTGGGCGCCGTCGC 111	
scabiei-87.22	TTAC-CGCTC-TCGGGCGCCGTCGC 131	
spec-CCM-MD2014	TTGC-CGCTC-TCGGGCGCCGTCGC 128	
spec-CFMR-7	TTAGTGGCTCCACGGGCGCCGTCGC 113	

Abb. 6.13: Konservierung der sRNA scr6925

Die Sequenz der sRNA aus *S. coelicolor* ist grau hinterlegt. Die Boxen stellen die *loop*-Regionen der Sekundärstruktur dar. Aufgelistet sind die Namen der Arten von *Streptomyces*.

6.3.3 Inhaltsstoffe von Soja

Die Inhaltsstoffe für Soja sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Die Angaben wurden von der USDA (National Nutrient Database) veröffentlicht.

Tab. 6.5: Inhaltsstoffe der ganzen Sojabohne,
veröffentlicht durch: USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 27
Full Report (All Nutrients) 16108, Soybeans, mature seeds, raw
Report Date: September 26, 2015 07:18 EDT
Food Group: Legumes and Legume Products

Inhaltsstoff	Einheit	Menge/ 100 g
Wasser	g	8,54
Energie	kcal kJ	446 1866
Protein	g	36,49
Fett	g	19,94
Asche	g	4,87
Kohlenhydrate	g	30,16
Ballaststoffe	g	9,3

Zucker	g	7,33
Mineralstoffe		
Calcium	mg	277
Eisen	mg	15,7
Magnesium	mg	280
Phosphor	mg	704
Kalium	mg	1797
Natrium	mg	2
Zink	mg	4,89
Kupfer	mg	1658
Mangan	mg	2517
Selen	µg	17,8
Vitamine		
Vitamin C	mg	6
Thiamin	mg	0,874
Riboflavin	mg	0,87
Niacin	mg	1623
Pantothensäure	mg	0,793
Vitamin B-6	mg	0,377
Folat (gesamt)	µg	375
Cholin	mg	115,9
Betain	mg	2,1
Vitamin B12	µg	0
Vitamin A, RAE	µg	1
Retinol	µg	0
Carotin, beta	µg	13
Carotin, alpha	µg	0
Cryptoxanthin, beta	µg	0
Vitamin A, IU	IU	22
Lycopene	µg	0
Lutein+ Zeaxanthin	µg	0
Vitamin E (alpha-Tocopherol)	mg	0,85
Vitamin D (D2 + D3)	IU	0
Vitamin K (Phylloquinone)	µg	47
Lipide		
Fettsäuren (Gesamt, gesättigt)	g	2884
14:0	g	0,055
16:0	g	2116
18:0	g	0,712
Fettsäuren (Gesamt, einfach ungesättigt)	g	4404
16:1 undifferenziert	g	0,055
18:1 undifferenziert	g	4348
Fettsäuren (Gesamt, mehrfach ungesättigt)	g	11255
18:2 undifferenziert	g	9925

18:3 undifferenziert	g	1330
Cholesterol	mg	0
Phytosterole	mg	161
<i>Aminosäuren</i>		
Tryptophan	g	0,591
Threonin	g	1766
Isoleucin	g	1971
Leucin	g	3309
Lysin	g	2706
Methionin	g	0,547
Cystein	g	0,655
Phenylalanin	g	2122
Tyrosin	g	1539
Valin	g	2029
Arginin	g	3153
Histidin	g	1097
Alanin	g	1915
Aspartat	g	5112
Glutamat	g	7874
Glycin	g	1880
Prolin	g	2379
Serin	g	2357
<i>Weitere</i>		
Alkohol	g	0
Koffein	mg	0
Theobromin	mg	0
<i>Flavonoide</i>		
Flavan-3-ole		
(-)-Epicatechin	mg	37,4
<i>Isoflavone</i>		
Daidzein	mg	62,9
Genistein	mg	81,4
Glycitein	mg	15,3
Isoflavone (Gesamt)	mg	155,8
Biochanin A	mg	0
Formononetin	mg	8,5
Coumestrol	mg	0
Proanthocyanidin	mg	0
Proanthocyanidin Monomere	mg	0
Proanthocyanidin Dimere	mg	0
Proanthocyanidin Trimere	mg	0
Proanthocyanidin 4-6mere	mg	0
Proanthocyanidin 7-10mere	mg	0
Proanthocyanidin >10mere	mg	0

6.3.4 Wuchsverhalten der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 mit verschiedenen Aminosäuren

In den folgenden Abbildungen ist das in Tabelle 3.12 zusammengefasste Wuchsverhalten der Stämme des Wildtyps und der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP und 6delP) dargestellt. Die Platten aus Mannitol-Medium mit Zusätzen bzw. Soja-Mannitol-Medium wurden nach 72 h bei 28°C fotografisch dokumentiert.

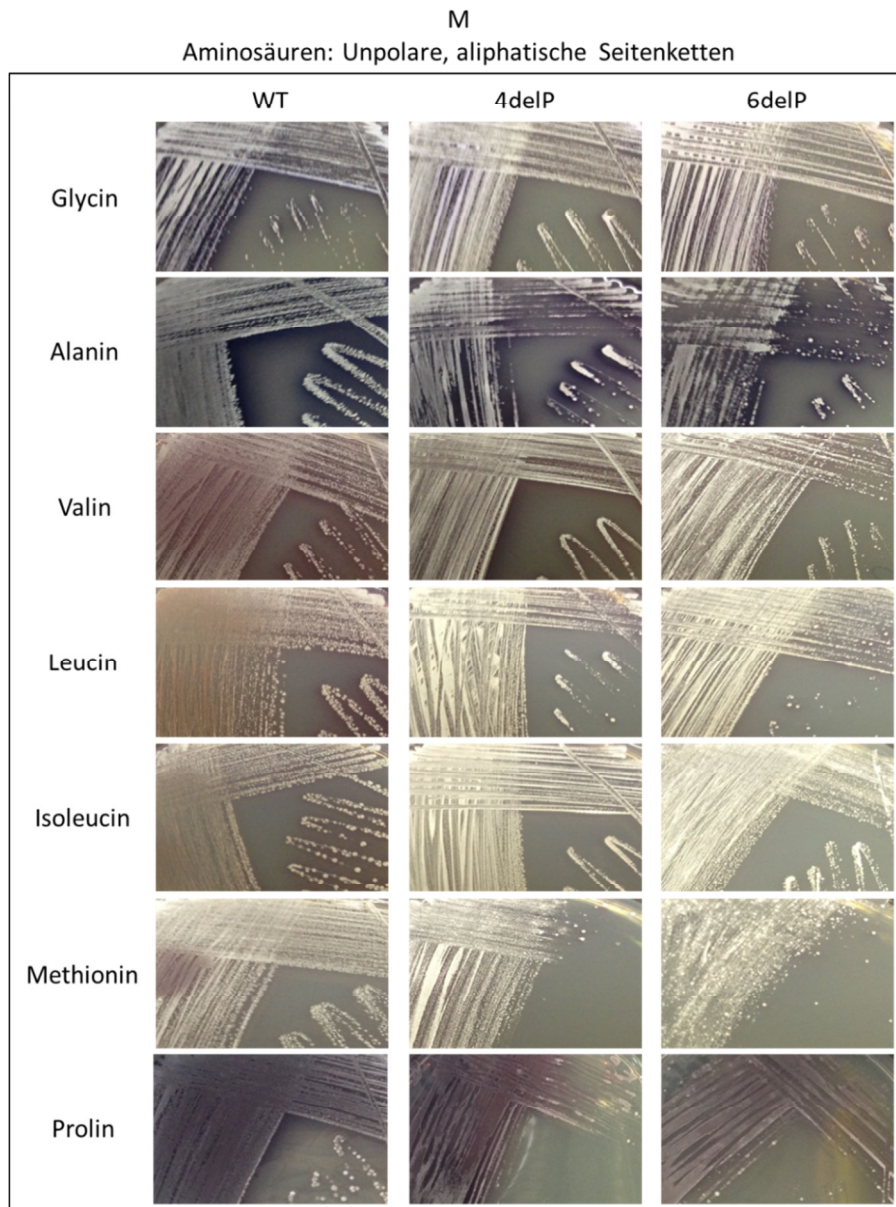


Abbildung 6.14: Mannitol-Medium mit zugefügten unpolar aliphatischen Aminosäuren

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Methionin und Prolin wurden in 1% Endkonzentration zum Mannitol-Medium (M) zugefügt. Leucin wurde in 0,96% Endkonzentration zugegeben. Der Wildtyp von *S. coelicolor* (WT) und die Deletionsstämme von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden für 72 h bei 28°C auf den Medien inkubiert.

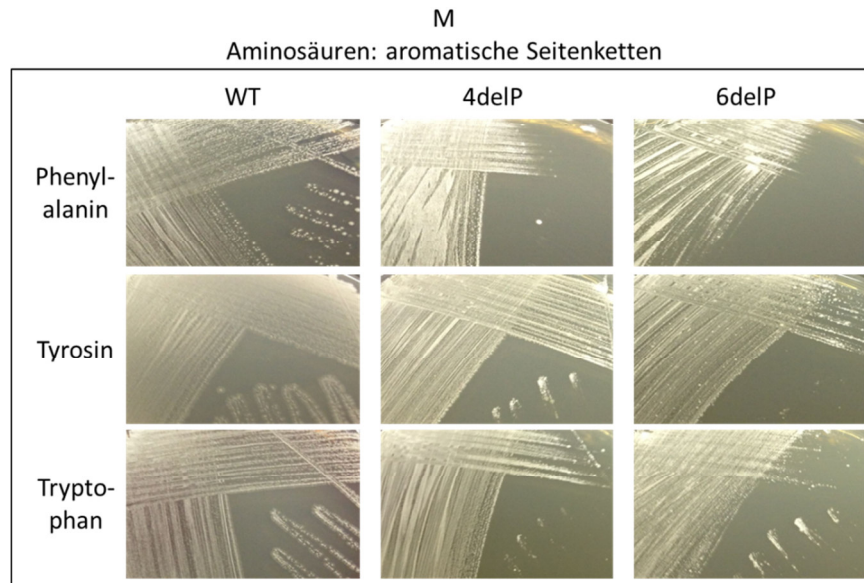


Abbildung 6.15: Mannitol-Medium mit zugefügten aromatischen Aminosäuren

Die Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan wurden Mannitol-Medium (M) in 1% Endkonzentration zugefügt. Tyrosin hatte eine Endkonzentration von 0,04%. Die Zellen des Wildtyps (WT) und der Deletionen von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden für 72 h bei 28°C angezogen.

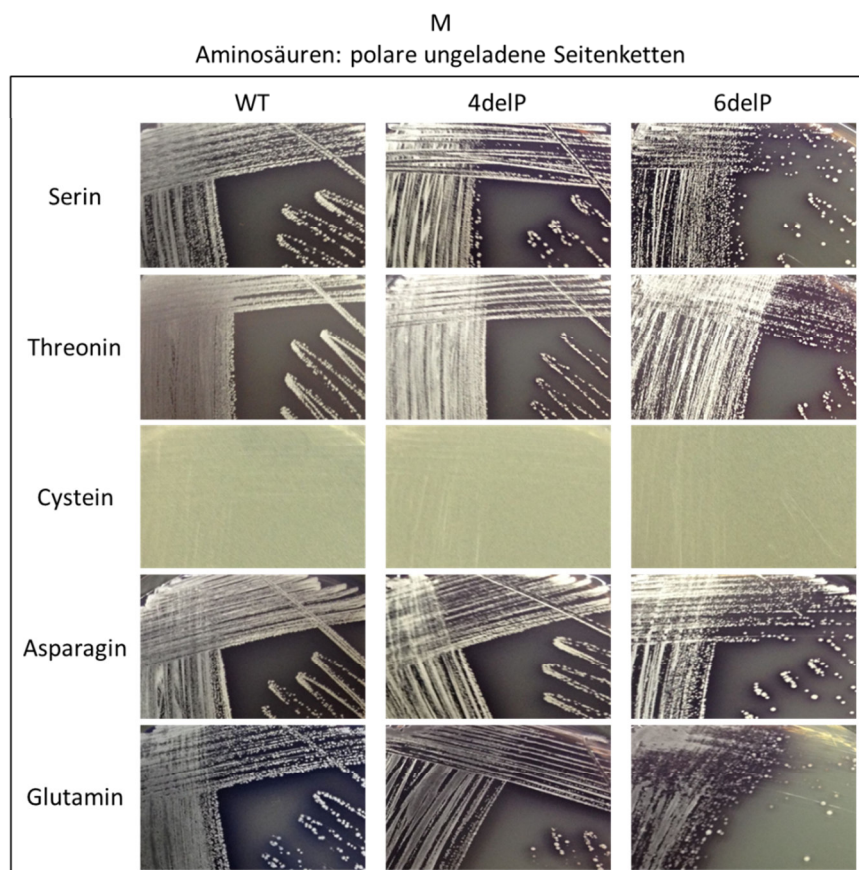


Abbildung 6.16: Mannitol-Medium mit zugefügten Aminosäuren mit polaren ungeladenen Seitenketten

Die Aminosäuren Serin, Threonin, Cystein und Glutamin wurden in 1% Endkonzentration zum Mannitol-Medium (M) zugefügt. Asparagin wurde in 0,88% Endkonzentration zugesetzt. Der Wildtyp (WT) und die Deletionsstämme von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden auf den Medien angezogen und das Wachstum nach 72 h bei 28°C dokumentiert.

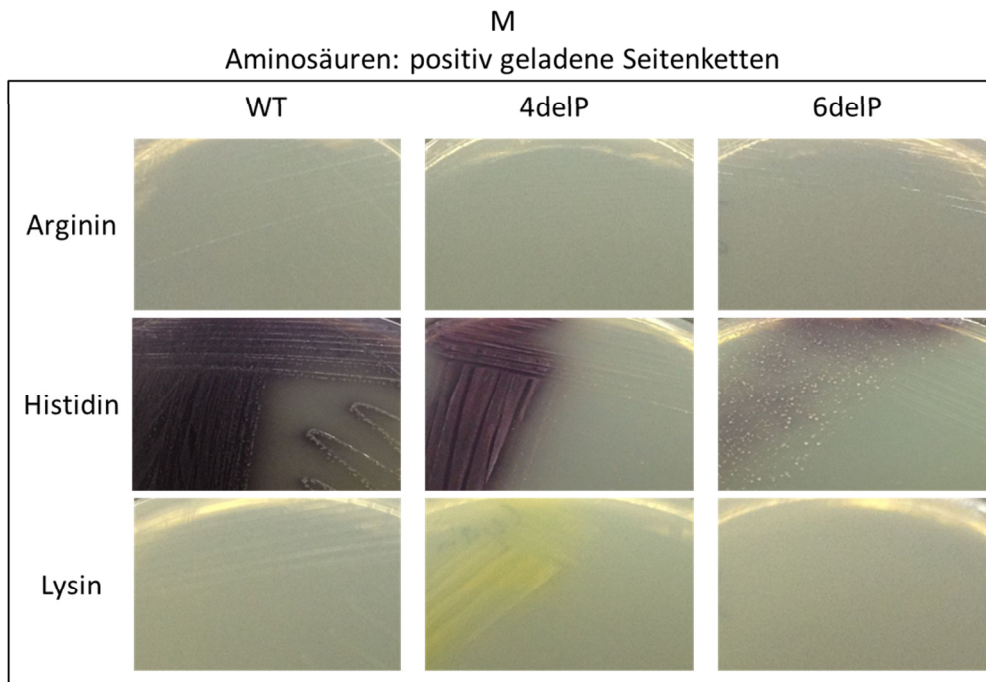


Abbildung 6.17: Mannitol-Medium mit zugefügten Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten

Die Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin wurden Mannitol-Medium (M) in 1% Endkonzentration hinzugefügt. Die Zellen des Wildtyps (WT) und der Deletionsstämmen von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden für 72 h bei 28°C auf den Medien angezogen.

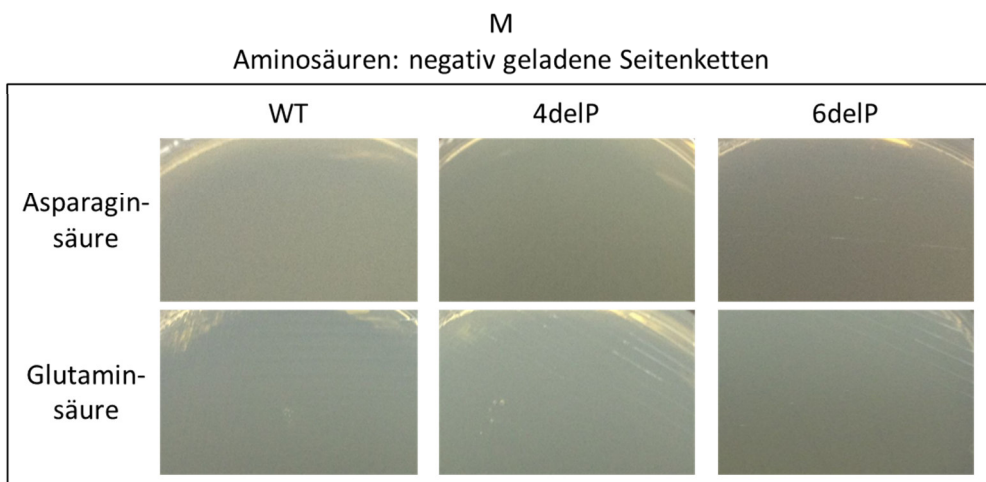


Abbildung 6.18: Mannitol-Medium mit zugefügten Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten

Die Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden Mannitol-Medium (M) in einer Endkonzentration von 1% hinzugefügt. Die Zellen des Wildtyps (WT) und der Deletionen von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden für 72 h bei 28°C auf den jeweiligen Medien angezogen.

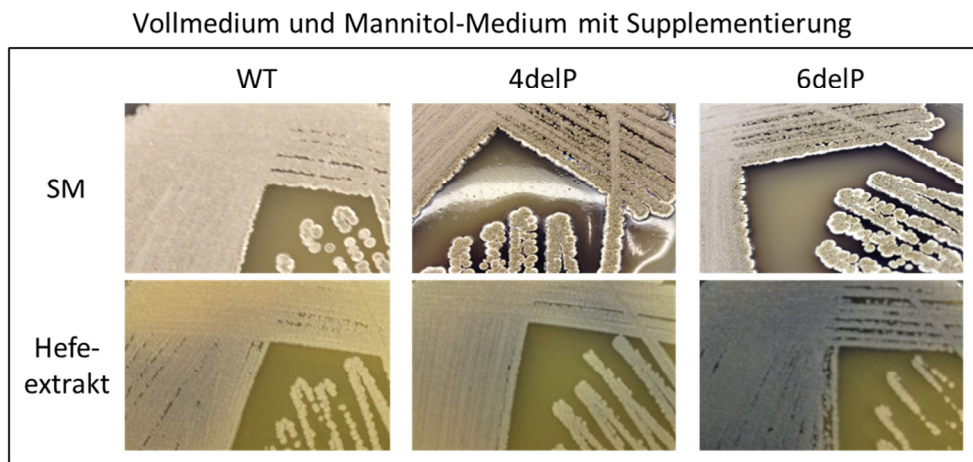


Abbildung 6.19: Soja-Mannitol-Medium und Mannitol-Medium mit Hefeextrakt

Der Wildtyp (WT) und die Deletionsstämme von scr4632 (4delP) und scr6925 (6delP) wurden auf Soja-Mannitol-Medium (SM) und Mannitol-Medium (M) mit supplementiertem Hefeextrakt für 72 h bei 28°C angezogen. Der Hefeextrakt wurde in 1% Endkonzentration zugegeben.

6.3.5 Wuchsverhalten des Wildtyps auf Festmedium mit aufgelegter Folie

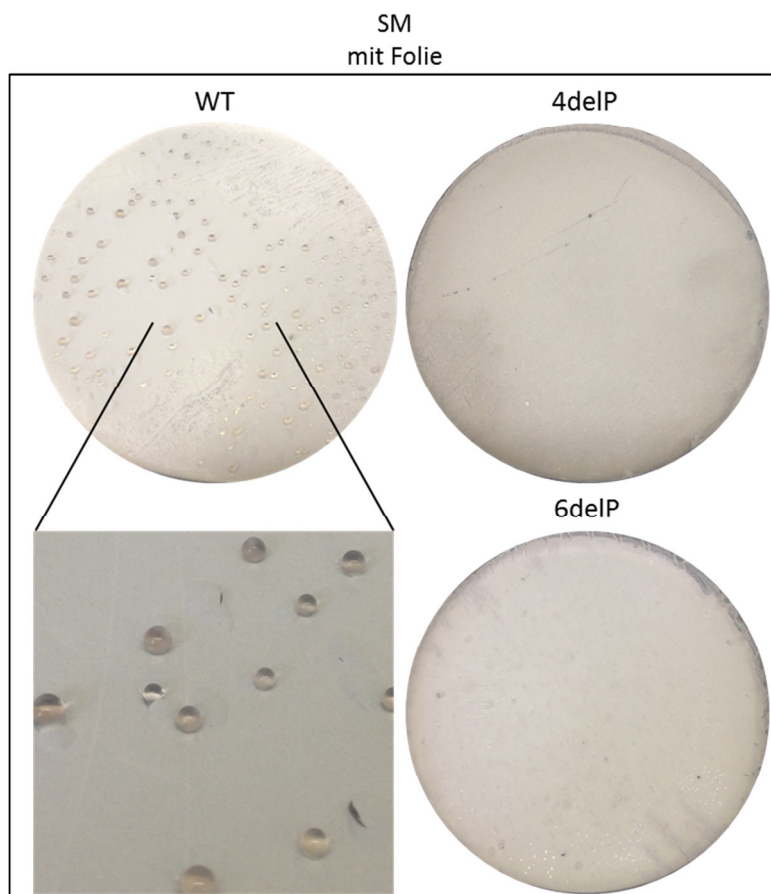


Abbildung 6.20: Anzucht des Wildtyps und der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 auf Soja-Mannitol-Medium mit aufgelegter Folie

Vorgekeimte Sporensuspensionen des Wildtyps (WT) sowie der Deletionsstämme von scr4632 und scr6925 (4delP bzw. 6delP) wurden für 144 h auf SM angezogen. Der WT sezernierte eine leicht trübe Flüssigkeit. Diese hatte jedoch keine goldene Einfärbung. Eine solche Sekretion des WT konnte bei einer kürzeren Inkubationszeit und vor allem ohne Folie nicht beobachtet werden. 4delP und 6delP produzierten auf Medium mit aufgelegter Folie keine goldfarbene Substanz, ohne Folie jedoch sehr viel (Abb. 3.56).

6.3.6 Massenspektrometrische Analyse der Proteinproben des Deletionsstamms von scr4632

Protein ID	Proteinbande α Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q93IU2	>tr Q93IU2 Q93IU2_STRCO BldKB, putative ABC transport system lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5113 PE=4 SV=1	44	65,5	77
Q9KZF3	>tr Q9KZF3 Q9KZF3_STRCO Isocitrate dehydrogenase OS=Streptomyces coelicolor GN=idh PE=3 SV=1	50	79,5	73
Q9L2F9	>tr Q9L2F9 Q9L2F9_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2524 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2524 PE=4 SV=1	42	68,7	66
Q9F323	>sp Q9F323 SYD_STRCO Aspartate--tRNA ligase OS=Streptomyces coelicolor GN=aspS PE=3 SV=1	35	66,0	57
Q86572	>tr Q86572 Q86572_STRCO Putative oligopeptide-binding lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5477 PE=4 SV=1	28	65,3	53
Q9L278	>sp Q9L278 SYT_STRCO Threonine--tRNA ligase OS=Streptomyces coelicolor GN=thrS PE=3 SV=1	40	74,6	52
Q8CJM7	>tr Q8CJM7 Q8CJM7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6492 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6492 PE=4 SV=1	30	73,8	50
Q9XAJ2	>tr Q9XAJ2 Q9XAJ2_STRCO Putative peptide hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3610 PE=4 SV=1	26	65,7	49
Q9RDB4	>tr Q9RDB4 Q9RDB4_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2837 PE=4 SV=1	26	70,8	46
Q9F348	>tr Q9F348 Q9F348_STRCO Putative peptidase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5122 PE=4 SV=1	32	75,9	46
Q9XAC1	>tr Q9XAC1 Q9XAC1_STRCO Transketolase A OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1935 PE=3 SV=1	28	75,0	44
Q9ZBI6	>tr Q9ZBI6 Q9ZBI6_STRCO Putative acyl-peptide hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6488 PE=4 SV=1	24	70,8	43
Q9X7N8; Q9X7Y4	>tr Q9X7N8 Q9X7N8_STRCO Putative fatty acid oxidative multifunctional enzyme OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6732 PE=4 SV=1	31	77,7	43
Q05558	>sp Q05558 DNAK_STRCO Chaperone protein DnaK OS=Streptomyces coelicolor GN=dnaK PE=2 SV=1	22	66,3	41
Q9L1K2	>sp Q9L1K2 GLGE1_STRCO Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=glgE1 PE=1 SV=1	24	75,3	40
Q9X9W4	>tr Q9X9W4 Q9X9W4_STRCO Putative large secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1908 PE=4 SV=1	20	64,7	40
Q9RKK5	>sp Q9RKK5 PURL_STRCO Phosphoribosylformylglycinamidine synthase 2 OS=Streptomyces coelicolor GN=purL PE=3 SV=1	28	79,9	39
Q8CJQ6	>sp Q8CJQ6 PNP_STRCO Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=pnp PE=3 SV=1	26	79,4	38
Q8CJL4	>tr Q8CJL4 Q8CJL4_STRCO Putative acetolactate synthase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6975 PE=3 SV=1	17	66,4	37
Q8CJM0	>tr Q8CJM0 Q8CJM0_STRCO Putative phospholipase C OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6691 PE=4 SV=1	19	75,7	33
Q9L0P5	>tr Q9L0P5 Q9L0P5_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4246 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4246 PE=4 SV=1	20	68,1	32
Q93J50	>tr Q93J50 Q93J50_STRCO Putative secreted esterase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3053 PE=4 SV=1	16	74,0	31
Q9RJA0	>tr Q9RJA0 Q9RJA0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0664 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0664 PE=4 SV=1	15	67,5	29
Q8CK48	>tr Q8CK48 Q8CK48_STRCO Putative oxidoreductase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0691 PE=4 SV=1	15	74,3	29
Q9L0P7	>tr Q9L0P7 Q9L0P7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4244 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4244 PE=4 SV=1	16	70,8	29
Q9RJK2	>tr Q9RJK2 Q9RJK2_STRCO Putative asparagine synthetase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0386 PE=4 SV=1	18	71,3	29
Q9X8I4	>tr Q9X8I4 Q9X8I4_STRCO ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=ftsH1 PE=3 SV=1	14	72,1	27
Q9KZ90	>tr Q9KZ90 Q9KZ90_STRCO Putative succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4856 PE=4 SV=1	14	64,8	26
Q9XA29	>tr Q9XA29 Q9XA29_STRCO Putative dehydrogenase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3835 PE=4 SV=1	11	60,0	23
Q9L065	>tr Q9L065 Q9L065_STRCO Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2789 PE=3 SV=1	13	66,1	22
Q86636	>tr Q86636 Q86636_STRCO Putative peptide transport system secreted peptide binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5716 PE=4 SV=1	14	67,5	21
Q9X928	>sp Q9X928 ACSA_STRCO Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Streptomyces coelicolor GN=acsA PE=3 SV=1	14	71,0	21
Q9RJK0	>tr Q9RJK0 Q9RJK0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0388 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0388 PE=4 SV=1	13	71,1	20
Q9F392	>tr Q9F392 Q9F392_STRCO Putative secreted hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7583 PE=4 SV=1	9	67,7	17
Q69855	>tr Q69855 Q69855_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6025 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6025 PE=4 SV=1	9	70,2	16
Q9EWHO	>tr Q9EWHO Q9EWHO_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4975 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4975 PE=4 SV=1	8	73,9	16
Q69198	>sp Q69198 ILVD_STRCO Dihydroxy-acid dehydratase OS=Streptomyces coelicolor GN=ilvD PE=3 SV=2	10	65,1	15

Abbildung 6.21: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande α
Die möglichen Proteine wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. Das grau hinterlegte Protein BldKB wurde in drei weiteren Proteinproben gefunden.

Proteinbande β				
Protein ID	Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q93IU2	>tr Q93IU2 Q93IU2_STRCO BldKB, putative ABC transport system lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5113 PE=4 SV=1	36	65,5	62
Q9KZF3	>tr Q9KZF3 Q9KZF3_STRCO Isocitrate dehydrogenase OS=Streptomyces coelicolor GN=idh PE=3 SV=1	37	79,5	46
Q05558	>sp Q05558 DNAK_STRCO Chaperone protein DnaK OS=Streptomyces coelicolor GN=dnaK PE=2 SV=1	27	66,3	45
Q9F323	>sp Q9F323 SYD_STRCO Aspartate--tRNA ligase OS=Streptomyces coelicolor GN=aspS PE=3 SV=1	28	66,0	41
Q9F348	>tr Q9F348 Q9F348_STRCO Putative peptidase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5122 PE=4 SV=1	27	75,9	38
Q9L278	>sp Q9L278 SYT_STRCO Threonine--tRNA ligase OS=Streptomyces coelicolor GN=thrS PE=3 SV=1	28	74,6	37
Q9L2F9	>tr Q9L2F9 Q9L2F9_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2524 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2524 PE=4 SV=1	24	68,7	37
Q9XAJ2	>tr Q9XAJ2 Q9XAJ2_STRCO Putative peptide hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3610 PE=4 SV=1	19	65,7	36
Q86572	>tr Q86572 Q86572_STRCO Putative oligopeptide-binding lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5477 PE=4 SV=1	21	65,3	35
Q9L0P5	>tr Q9L0P5 Q9L0P5_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4246 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4246 PE=4 SV=1	23	68,1	32
Q9X7N8; Q9X7Y4	>tr Q9X7N8 Q9X7N8_STRCO Putative fatty acid oxidative multifunctional enzyme OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6732 PE=4 SV=1	26	77,7	32
Q9XAC1	>tr Q9XAC1 Q9XAC1_STRCO Transketolase A OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1935 PE=3 SV=1	23	75,0	32
Q9RDB4	>tr Q9RDB4 Q9RDB4_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2837 PE=4 SV=1	18	70,8	30
Q9X8I4	>tr Q9X8I4 Q9X8I4_STRCO ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=ftsH1 PE=3 SV=1	16	72,1	28
Q9L0P7	>tr Q9L0P7 Q9L0P7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4244 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4244 PE=4 SV=1	17	70,8	28
Q8CJM7	>tr Q8CJM7 Q8CJM7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6492 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6492 PE=4 SV=1	17	73,8	27
Q9X928	>sp Q9X928 ACSA_STRCO Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Streptomyces coelicolor GN=acsA PE=3 SV=1	18	71,0	27
Q9ZBI6	>tr Q9ZBI6 Q9ZBI6_STRCO Putative acyl-peptide hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6488 PE=4 SV=1	16	70,8	26
Q8CK48	>tr Q8CK48 Q8CK48_STRCO Putative oxidoreductase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0691 PE=4 SV=1	18	74,3	26
Q8CJQ6	>sp Q8CJQ6 PNP_STRCO Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=pnp PE=3 SV=1	20	79,4	25
Q93J50	>tr Q93J50 Q93J50_STRCO Putative secreted esterase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3053 PE=4 SV=1	14	74,0	24
Q9RJK0	>tr Q9RJK0 Q9RJK0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0388 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0388 PE=4 SV=1	16	71,1	22
Q9KZ90	>tr Q9KZ90 Q9KZ90_STRCO Putative succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4856 PE=4 SV=1	13	64,8	22
Q9X9W4	>tr Q9X9W4 Q9X9W4_STRCO Putative large secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1908 PE=4 SV=1	14	64,7	22
Q9RKK5	>sp Q9RKK5 PURL_STRCO Phosphoribosylformylglycinamide synthase 2 OS=Streptomyces coelicolor GN=purL PE=3 SV=1	19	79,9	21
Q9XA29	>tr Q9XA29 Q9XA29_STRCO Putative dehydrogenase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3835 PE=4 SV=1	10	60,0	21
Q8CJM0	>tr Q8CJM0 Q8CJM0_STRCO Putative phospholipase C OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6691 PE=4 SV=1	13	75,7	21
Q9EWH0	>tr Q9EWH0 Q9EWH0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4975 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4975 PE=4 SV=1	11	73,9	21
Q9RJA0	>tr Q9RJA0 Q9RJA0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0664 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0664 PE=4 SV=1	12	67,5	21
Q9L1K2	>sp Q9L1K2 GLGE1_STRCO Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=glgE1 PE=1 SV=1	12	75,3	20
O69855	>tr O69855 O69855_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6025 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6025 PE=4 SV=1	12	70,2	19
Q9F392	>tr Q9F392 Q9F392_STRCO Putative secreted hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7583 PE=4 SV=1	10	67,7	17
O69198	>sp O69198 ILVD_STRCO Dihydroxy-acid dehydratase OS=Streptomyces coelicolor GN=ilvD PE=3 SV=2	11	65,1	17
Q8CJL4	>tr Q8CJL4 Q8CJL4_STRCO Putative acetolactate synthase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6975 PE=3 SV=1	10	66,4	16
Q9L065	>tr Q9L065 Q9L065_STRCO Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2789 PE=3 SV=1	9	66,1	16
O86636	>tr O86636 O86636_STRCO Putative peptide transport system secreted peptide binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5716 PE=4 SV=1	10	67,5	15
Q9RJK2	>tr Q9RJK2 Q9RJK2_STRCO Putative asparagine synthetase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0386 PE=4 SV=1	11	71,3	15

Abbildung 6.22: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande β
 Die Rohdaten wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. Das in drei weiteren Proben gefundene Protein BldKB ist grau hinterlegt.

Proteinbande γ				
Protein ID	Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q9RJJ4;REV_Q9Z4X8	>tr Q9RJJ4 Q9RJJ4_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0394 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0394 PE=4 SV=1	13	23,8	55
Q9KXI2	>tr Q9KXI2 Q9KXI2_STRCO Putative O-methyltransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2338 PE=4 SV=1	10	23,6	49
Q9KXP5	>sp Q9KXP5 RS4_STRCO 30S ribosomal protein S4 OS=Streptomyces coelicolor GN=rpsD PE=3 SV=1	10	23,6	47
Q9KY22	>tr Q9KY22 Q9KY22_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2368 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2368 PE=1 SV=1	6	20,4	42
Q9L0E0	>sp Q9L0E0 RL3_STRCO 50S ribosomal protein L3 OS=Streptomyces coelicolor GN=rplC PE=3 SV=1	10	22,8	42
Q9WX11	>tr Q9WX11 Q9WX11_STRCO Putative RNA polymerase sigma factor OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3323 PE=4 SV=1	7	20,0	40
O86609	>tr O86609 O86609_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6340 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6340 PE=4 SV=1	7	23,1	37
Q9AK96	>tr Q9AK96 Q9AK96_STRCO Putative uncharacterized protein SCO1366 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1366 PE=4 SV=1	7	22,8	36
Q9RKV8	>tr Q9RKV8 Q9RKV8_STRCO Putative phosphatase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6218 PE=4 SV=1	8	21,9	36
Q9KXW4	>tr Q9KXW4 Q9KXW4_STRCO Putative tellurium resistance protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4277 PE=4 SV=1	5	20,3	36
Q9S2V2	>sp Q9S2V2 THIE_STRCO Thiamine-phosphate synthase OS=Streptomyces coelicolor GN=thiE PE=3 SV=1	6	23,4	32
Q9L0D9	>sp Q9L0D9 RL4_STRCO 50S ribosomal protein L4 OS=Streptomyces coelicolor GN=rplD PE=3 SV=1	5	23,6	30
O86667	>tr O86667 O86667_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6375 PE=4 SV=1	9	22,4	28
O86852	>tr O86852 O86852_STRCO Gamma-butyrolactone binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=scbR PE=4 SV=1	8	23,9	27
O86531	>tr O86531 O86531_STRCO Putative transcriptional regulator OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5550 PE=1 SV=1	8	23,8	27
Q9X469	>tr Q9X469 Q9X469_STRCO Superoxide dismutase OS=Streptomyces coelicolor GN=sodF2 PE=3 SV=1	5	23,6	27
Q9KY80	>tr Q9KY80 Q9KY80_STRCO Putative lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5022 PE=4 SV=1	5	23,4	26
Q9RDP9	>tr Q9RDP9 Q9RDP9_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2385 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2385 PE=3 SV=1	5	23,4	25
Q9L201	>tr Q9L201 Q9L201_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2634 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2634 PE=4 SV=1	6	24,0	23
Q9S2U0	>tr Q9S2U0 Q9S2U0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2045 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2045 PE=4 SV=1	6	23,6	23
Q9L0M7	>tr Q9L0M7 Q9L0M7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4633 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4633 PE=4 SV=1	4	22,2	23
O51917	>sp O51917 SODF_STRCO Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=sodF1 PE=1 SV=3	4	23,5	22
Q9K4M1	>tr Q9K4M1 Q9K4M1_STRCO Putative uncharacterized protein SCO7293 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7293 PE=4 SV=1	5	23,8	21
Q9L015	>tr Q9L015 Q9L015_STRCO KHG/KDPG aldolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2298 PE=4 SV=1	4	21,9	21
Q93IU2	>tr Q93IU2 Q93IU2_STRCO BldKB, putative ABC transport system lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5113 PE=4 SV=1	6	65,5	11

Abbildung 6.23: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande γ

Die Rohdaten wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. BldKB wurde hinzugenommen, da es in der anderen hochregulierten Bande des gleichen Stammes als mögliches Protein ermittelt wurde. Es könnte sich bei diesem Protein um ein Abbauprodukt von BldKB handeln.

Proteinbande 6				
Protein ID	Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q9RJJ4;REV_Q9Z4X8	>tr Q9RJJ4 Q9RJJ4_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0394 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0394 PE=4 SV=1	13	23,8	54
Q9KXP5	>sp Q9KXP5 RS4_STRCO 30S ribosomal protein S4 OS=Streptomyces coelicolor GN=rpsD PE=3 SV=1	11	23,6	48
Q9KXI2	>tr Q9KXI2 Q9KXI2_STRCO Putative O-methyltransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2338 PE=4 SV=1	10	23,6	47
Q9KY22	>tr Q9KY22 Q9KY22_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2368 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2368 PE=1 SV=1	6	20,4	42
Q9L0E0	>sp Q9L0E0 RL3_STRCO 50S ribosomal protein L3 OS=Streptomyces coelicolor GN=rplC PE=3 SV=1	9	22,8	41
Q9AK96	>tr Q9AK96 Q9AK96_STRCO Putative uncharacterized protein SCO1366 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1366 PE=4 SV=1	7	22,8	36
Q9WX11	>tr Q9WX11 Q9WX11_STRCO Putative RNA polymerase sigma factor OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3323 PE=4 SV=1	6	20,0	36
Q9RKV8	>tr Q9RKV8 Q9RKV8_STRCO Putative phosphatase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6218 PE=4 SV=1	8	21,9	36
Q9L0D9	>sp Q9L0D9 RL4_STRCO 50S ribosomal protein L4 OS=Streptomyces coelicolor GN=rplD PE=3 SV=1	7	23,6	36
Q9L0M7	>tr Q9L0M7 Q9L0M7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4633 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4633 PE=4 SV=1	6	22,2	35
O86609	>tr O86609 O86609_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6340 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6340 PE=4 SV=1	6	23,1	33
Q9S2V2	>sp Q9S2V2 THIE_STRCO Thiamine-phosphate synthase OS=Streptomyces coelicolor GN=thiE PE=3 SV=1	6	23,4	32
O86852	>tr O86852 O86852_STRCO Gamma-butyrolactone binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=scbR PE=4 SV=1	9	23,9	32
Q9X469	>tr Q9X469 Q9X469_STRCO Superoxide dismutase OS=Streptomyces coelicolor GN=sodF2 PE=3 SV=1	7	23,6	30
Q9S2U0	>tr Q9S2U0 Q9S2U0_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2045 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2045 PE=4 SV=1	7	23,6	29
O51917	>sp O51917 SODF_STRCO Superoxide dismutase [Fe-Zn] 1 OS=Streptomyces coelicolor GN=sodF1 PE=1 SV=3	6	23,5	29
O86667	>tr O86667 O86667_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6375 PE=4 SV=1	9	22,4	28
O86531	>tr O86531 O86531_STRCO Putative transcriptional regulator OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5550 PE=1 SV=1	6	23,8	26
Q9RDP9	>tr Q9RDP9 Q9RDP9_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2385 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2385 PE=3 SV=1	5	23,4	25
Q9KXW4	>tr Q9KXW4 Q9KXW4_STRCO Putative tellurium resistance protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4277 PE=4 SV=1	4	20,3	25
Q9L201	>tr Q9L201 Q9L201_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2634 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2634 PE=4 SV=1	6	24,0	23
Q9KY80	>tr Q9KY80 Q9KY80_STRCO Putative lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5022 PE=4 SV=1	4	23,4	22
Q9K4M1	>tr Q9K4M1 Q9K4M1_STRCO Putative uncharacterized protein SCO7293 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7293 PE=4 SV=1	5	23,8	22
Q9L015	>tr Q9L015 Q9L015_STRCO KHG/KDPG aldolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2298 PE=4 SV=1	4	21,9	21
Q93IU2	>tr Q93IU2 Q93IU2_STRCO BldKB, putative ABC transport system lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5113 PE=4 SV=1	9	65,5	16

Abbildung 6.24: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande 6

Die Rohdaten wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. BldKB wurde hinzugenommen, da es in der anderen hochregulierten Bande des gleichen Stammes als mögliches Protein ermittelt wurde. Es könnte sich bei diesem Protein um ein Abbauprodukt von BldKB handeln.

Proteinbande ε				
Protein ID	Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q9S2W3	>tr Q9S2W3 Q9S2W3_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2093 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2093 PE=4 SV=1	4	18,4	22
Q9RI59	>tr Q9RI59 Q9RI59_STRCO Putative small secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0119 PE=4 SV=1	4	18,5	22
Q9EWQ4	>tr Q9EWQ4 Q9EWQ4_STRCO Putative lipoprotein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7673 PE=4 SV=1	2	19,1	20
Q9Z582	>tr Q9Z582 Q9Z582_STRCO Putative uncharacterized protein SCO5497 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5497 PE=4 SV=1	3	17,4	20
Q9RJM9	>tr Q9RJM9 Q9RJM9_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0615 PE=4 SV=1	2	15,9	18
Q9F3P0	>tr Q9F3P0 Q9F3P0_STRCO Putative calcium binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7647 PE=4 SV=1	3	19,5	16
Q9Z4W2	>tr Q9Z4W2 Q9Z4W2_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3222 PE=1 SV=1	2	16,4	13
P61152	>sp P61152 SSI_STRCO Subtilase-type protease inhibitor OS=Streptomyces coelicolor GN=sti1 PE=3 SV=1	1	14,4	13
Q9F2L4	>tr Q9F2L4 Q9F2L4_STRCO Putative uncharacterized protein SCO3767 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3767 PE=4 SV=1	3	16,6	12
Q9X8L7	>tr Q9X8L7 Q9X8L7_STRCO Putative uncharacterized protein SCO3353 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3353 PE=4 SV=1	1	13,3	10
P80735	>sp P80735 SODN_STRCO Superoxide dismutase [Ni] OS=Streptomyces coelicolor GN=sodN PE=1 SV=2	1	14,7	9
Q9EX27	>tr Q9EX27 Q9EX27_STRCO Putative mut-like protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO1013 PE=4 SV=1	1	17,5	9
Q53868	>sp Q53868 Y3922_STRCO Uncharacterized protein SCO3922 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3922 PE=4 SV=2	1	13,4	9
Q9KYD9	>tr Q9KYD9 Q9KYD9_STRCO Putative integral membrane protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4131 PE=4 SV=1	1	10,4	9
Q9K4G5	>tr Q9K4G5 Q9K4G5_STRCO Putative uncharacterized protein SCO4173 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO4173 PE=4 SV=1	1	12,0	9
Q9FC59	>tr Q9FC59 Q9FC59_STRCO Putative uncharacterized protein SCO7127 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7127 PE=4 SV=1	1	18,5	8
Q9L2B5	>tr Q9L2B5 Q9L2B5_STRCO Putative transcriptional regulator OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5405 PE=4 SV=1	1	18,3	8
Q9RDA3	>sp Q9RDA3 Y2848_STRCO UPF0303 protein SCO2848 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2848 PE=3 SV=1	1	17,2	7
Q9KZR6	>tr Q9KZR6 Q9KZR6_STRCO Putative uncharacterized protein SCO2885 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2885 PE=3 SV=1	1	16,8	7
P23154	>sp P23154 CYPC_STRCO Putative polyketide cyclase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5315 PE=1 SV=1	1	18,2	6
Q9RD05	>tr Q9RD05 Q9RD05_STRCO Putative uncharacterized protein SCO0906 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0906 PE=4 SV=1	1	18,9	6
Q9X8U3	>sp Q9X8U3 SSB2_STRCO Single-stranded DNA-binding protein 2 OS=Streptomyces coelicolor GN=ssb2 PE=1 SV=1	1	19,9	6
Q9ZBR1	>sp Q9ZBR1 COAD_STRCO Phosphopantetheine adenylyltransferase OS=Streptomyces coelicolor GN=coaD PE=3 SV=1	1	17,8	6
O86515	>tr O86515 O86515_STRCO Putative uncharacterized protein SCO5533 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO5533 PE=4 SV=1	1	20,0	5
Q9S2N0	>sp Q9S2N0 BFR_STRCO Bacterioferritin OS=Streptomyces coelicolor GN=bfr PE=3 SV=1	1	19,2	5
Q9L160	>tr Q9L160 Q9L160_STRCO Putative isochorismatase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO7455 PE=4 SV=1	1	19,9	5

Abbildung 6.25: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande ε
 Die Rohdaten wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. Die Untersuchung der ausgeschnittenen Proteinbande ε ergab eine Vielzahl möglicher Proteine.

Proteinbande ζ				
Protein ID	Beschreibung	Peptide	Molekular- gewicht [kDa]	Sequenz- ab- deckung [%]
Q9Z5A4	>tr Q9Z5A4 Q9Z5A4_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6198 PE=4 SV=1	27	116,7	29
O87848	>tr O87848 O87848_STRCO Putative uncharacterized protein SCO6593 OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6593 PE=4 SV=1	26	119,0	27
Q9RDQ1	>tr Q9RDQ1 Q9RDQ1_STRCO Putative secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2383 PE=4 SV=1	29	161,5	20
Q8CJP8	>tr Q8CJP8 Q8CJP8_STRCO Putative secreted ATP/GTP binding protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6004 PE=4 SV=1	17	138,1	13
Q9ZBF6	>tr Q9ZBF6 Q9ZBF6_STRCO Putative beta-galactosidase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO6457 PE=4 SV=1	16	145,5	10
Q9L1Z8	>tr Q9L1Z8 Q9L1Z8_STRCO Putative serine protease (Putative secreted protein) OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2637 PE=3 SV=1	12	114,3	10
Q9RKFO	>tr Q9RKFO Q9RKFO_STRCO Putative hydrolase OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO3487 PE=4 SV=1	8	88,6	10
Q9L0L0	>sp Q9L0L0 RPOB_STRCO DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Streptomyces coelicolor GN=rpoB PE=3 SV=1	8	128,5	7
Q9S2G1	>tr Q9S2G1 Q9S2G1_STRCO Putative secreted protease OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO2920 PE=4 SV=1	4	85,8	6
Q8CK54	>tr Q8CK54 Q8CK54_STRCO Putative large, multifunctional secreted protein OS=Streptomyces coelicolor GN=SCO0505 PE=4 SV=1	5	108,6	5
Q8CJQ8	>sp Q8CJQ8 IF2_STRCO Translation initiation factor IF-2 OS=Streptomyces coelicolor GN=infB PE=3 SV=1	5	105,7	5

Abbildung 6.26: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbande ζ

Die Rohdaten wurden nach Sequenzabdeckung und Größe sortiert. Die Untersuchung der ausgeschnittenen Proteinbande ζ ergab eine Vielzahl möglicher Proteine.

7 Literatur

- Abbas, AS, and Edwards, C (1990). Effects of Metals on *Streptomyces coelicolor* Growth and Actinorhodin Production. *Applied and Environmental Microbiology* 56.
- Alam, MT, Merlo, ME, Takano, E, and Breitling, R (2010). Genome-Based Phylogenetic Analysis of *Streptomyces* and Its Relatives. *Molecular phylogenetics and evolution* 54, 763-772.
- Altuvia, S (2007). Identification of Bacterial Small Non-Coding RNAs: Experimental Approaches. *Current opinion in microbiology* 10, 257-261.
- Altuvia, S, Wagner, E, and Gerhart, H (2000). Switching on and Off with RNA. *PNAS* 97.
- Altuvia, S, Weinstein-Fischer, D, Zhang, A, Postow, L, and Storz, G (1997). A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell* 90.
- Anderson, AS, and Wellington, EM (2001). The Taxonomy of *Streptomyces* and Related Genera. *Int J Syst Evol Microbiol* 51.
- Ando, Y, Asari, S, Suzuma, S, Yamane, K, and Nakamura, K (2002). Expression of a Small RNA, Bs203 RNA, from the Yoci⁺YocJ Intergenic Region of *Bacillus Subtilis* Genome. *FEMS Microbiol Lett* 207.
- Anne, J, Maldonado, B, Van Impe, J, Van Mellaert, L, and Bernaerts, K (2012). Recombinant Protein Production and Streptomyces. *Journal of biotechnology* 158, 159-167.
- Argaman, L, Hershberg, R, Vogel, J, Bejerano, G, Wagner, EG, Margalit, H, and Altuvia, S (2001). Novel Small RNA-Encoding Genes in the Intergenic Regions of *Escherichia Coli*. *Curr Biol* 11.
- Babski, J, Maier, LK, Heyer, R, Jaschinski, K, Prasse, D, Jager, D, Randau, L, Schmitz, RA, Marchfelder, A, and Soppa, J (2014). Small Regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biol* 11, 484-493.
- Baker, CS, Eory, LA, Yakhnin, H, Mercante, J, Romeo, T, and Babitzke, P (2007). CsrA Inhibits Translation Initiation of *Escherichia coli* Hfq by Binding to a Single Site Overlapping the Shine-Dalgarno Sequence. *Journal of bacteriology* 189, 5472-5481.
- Baneyx, F (1999). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10.
- Bascarán, V, Hardisson, C, and Brana, A (1989). Regulation of Nitrogen Catabolic Enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of General Microbiology* 135.
- Beisel, CL, and Storz, G (2011). Discriminating Tastes: Physiological Contributions of the Hfq-Binding Small RNA Spot 42 to Catabolite Repression. *RNA Biol* 8, 766-770.
- Belasco, J, and Higgins, C (1988). Mechanisms of mRNA Decay in Bacteria: A Perspective. *Gene* 72.
- Bentley, SD, Chater, KF, Cerdeño-Tárraga, AM, Challis, GL, Thomson, NR, James, KD, Harris, DE, Quail, MA, Kieser, H, Harper, D, et al. (2002). Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417.
- Bérdy, J (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of antibiotics* 58.
- Bibb, MJ (1996). The Regulation of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142.
- Bibb, MJ, and Buttner, MJ (2003). The *Streptomyces coelicolor* Developmental Transcription Factor bldN Is Synthesized as a Proprotein. *Journal of bacteriology* 185, 2338-2345.
- Blattner, FR, Plunkett, G, 3rd, Bloch, CA, Perna, NT, Burland, V, Riley, M, Collado-Vides, J, Glasner, JD, Rode, CK, Mayhew, GF, et al. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277.

- Borodina, I, Siebring, J, Zhang, J, Smith, CP, van Keulen, G, Dijkhuizen, L, and Nielsen, J (2008). Antibiotic Overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Mediated by Phosphofructokinase Deletion. The Journal of biological chemistry 283, 25186-25199.
- Brantl, S (2007). Regulatory Mechanisms Employed by Cis-Encoded Antisense RNAs. Current opinion in microbiology 10, 102-109.
- Brantl, S (2008). Cis Und Trans: Genregulation in Bakterien. Biospektrum 14.
- Brenner, S, Jacob, F, and Meselson, M (1961). An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. Nature 190.
- Brownlee, GG (1971). Sequence of 6s RNA of *E. coli*. Nature New Biology 229.
- Burns, KE, and Darwin, KH (2010). Pupylation Versus Ubiquitylation: Tagging for Proteasome-Dependent Degradation. Cellular microbiology 12, 424-431.
- Busch, A, Richter, AS, and Backofen, R (2008). Intarna: Efficient Prediction of Bacterial sRNA Targets Incorporating Target Site Accessibility and Seed Regions. Bioinformatics 24, 2849-2856.
- Buttner, MJ, Fearnley, IM, and Bibb, MJ (1987). The Agarase Gene (Daga) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis. Mol Gen Genet 209.
- Buttner, MJ, and Lewis, CG (1992). Construction and Characterization of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Mutants That Are Multiply Deficient in the Nonessential Hrd-Encoded Rna Polymerase Sigma Factors. Journal of bacteriology 174.
- Carthew, RW, and Sontheimer, EJ (2009). Origins and Mechanisms of miRNA and siRNAs. Cell 136, 642-655.
- Catakli, S, Andrieux, A, Decaris, B, and Dary, A (2005). Sigma Factor Whig and Its Regulation Constitute a Target of a Mutational Phenomenon Occurring During Aerial Mycelium Growth in *Streptomyces ambofaciens* Atcc23877. Research in microbiology 156, 328-340.
- Chakraborty, R, and Bibb, M (1997). The Ppgpp Synthetase Gene (Rela) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Plays a Conditional Role in Antibiotic Production and Morphological Differentiation. Journal of bacteriology 179.
- Chao, Y, Papenfort, K, Reinhardt, R, Sharma, CM, and Vogel, J (2012). An Atlas of Hfq-Bound Transcripts Reveals 3' Utrs as a Genomic Reservoir of Regulatory Small RNAs. The EMBO journal 31, 4005-4019.
- Chater, KF (1972). A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*. Journal of General Microbiology 72, 9.
- Chavez, A, Forero, A, Sanchez, M, Rodriguez-Sanoja, R, Mendoza-Hernandez, G, Servin-Gonzalez, L, Sanchez, B, Garcia-Huante, Y, Rocha, D, Langley, E, et al. (2011). Interaction of Sco2127 with Bldkb and Its Possible Connection to Carbon Catabolite Regulation of Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor*. Applied microbiology and biotechnology 89, 799-806.
- Coisne, S, Béchet, M, and Blondeau, R (1999). Actinorhodin Production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in Iron-Restricted Media. Lett Appl Microbiol 28.
- Coleman, J, Green, PJ, and Inouye, M (1984). The Use of RNAs Complementary to Specific mRNAs to Regulate the Expression of Individual Bacterial Genes. Cell 37.
- Coornaert, A, Chiaruttini, C, Springer, M, and Guillier, M (2013). Post-Transcriptional Control of the Escherichia Coli PhoQ-PhoP Two-Component System by Multiple sRNAs Involves a Novel Pairing Region of Gcvb. PLoS genetics 9, e1003156.
- D'Alia, D, Nieselt, K, Steigle, S, Muller, J, Verburg, I, and Takano, E (2010). Noncoding RNA of Glutamine Synthetase I Modulates Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of bacteriology 192, 1160-1164.

- Davies, BW, Bogard, RW, Young, TS, and Mekalanos, JJ (2012). Coordinated Regulation of Accessory Genetic Elements Produces Cyclic Di-Nucleotides for *V. cholerae* Virulence. *Cell* 149, 358-370.
- Demain, AL (1988). Contribution of Genetics to the Production and Discovery of Microbial Pharmaceuticals. *Pure and Applied Chemistry* 60.
- Demain, AL (1999). Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of Microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 52.
- Demain, AL, and Sanchez, S (2009). Microbial Drug Discovery: 80 Years of Progress. *The Journal of antibiotics* 62, 5-16.
- Dorman, CJ (2013). Genome Architecture and Global Gene Regulation in Bacteria: Making Progress Towards a Unified Model? *Nature Reviews Microbiology* 11, 349-55.
- Eddy, SR (1999). Noncoding RNA Genes. *Curr Opin Genet Dev* 9.
- Elliott, M, Damji, F, Passantino, R, Chater, K, and Leskiw, B (1998). The Bld Gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): A Regulatory Gene Involved in Morphogenesis and Antibiotic Production. *Journal of bacteriology* 180.
- Ensign, JC (1978). Formation, Properties, and Germination of Actinomycete Spores. *Annu Rev Microbiol* 32.
- Erikson, D (1948). Differentiation of the Vegetative and Sporogenous Phases of the Actinomycetes. *Microbiology* 2.
- Ferla, MP, and Patrick, WM (2014). Bacterial Methionine Biosynthesis. *Microbiology* 160, 1571-1584.
- Fink, D, Weissschuh, N, Reuther, J, Wohlleben, W, and Engels, A (2002). Two Transcriptional Regulators Glnr and Glnrii Are Involved in Regulation of Nitrogen Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 46.
- Fisher, S, and Wray, L, Jr (1989). Regulation of Glutamine Synthetase in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 171.
- Flores, ME (1996). Nitrogen Regulation of Urease Synthesis in *Saccharopolyspora erythraea* Atcc 11365. *FEMS Microbiology Letters* 139.
- Friedländer, MR, Lizano, E, Houben, AJ, Bezdan, D, Báñez-Coronel, M, Kudla, G, Mateu-Huertas, E, Kagerbauer, B, González, J, Chen, KC, *et al.* (2014). Evidence for the Biogenesis of More Than 1,000 Novel Human microRNAs. *Genome biology* 15.
- Friedman, RC, Farh, KK, Burge, CB, and Bartel, DP (2009). Most Mammalian Mrnas Are Conserved Targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.
- Geissmann, TA, Marzi, S, Romby, P (2009). The Role of mRNA Structure in Translational Control in Bacteria. *RNA Biology* 6, 153-160.
- Geissmann, TA, and Touati, D (2004). Hfq, a New Chaperoning Role: Binding to Messenger RNA Determines Access for Small RNA Regulator. *The EMBO journal* 23.
- Gimenez, R, Nunez, MF, Badia, J, Aguilar, J, and Baldoma, L (2003). The Gene Yjcg, Cotranscribed with the Gene Acs, Encodes an Acetate Permease in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 185, 6448-6455.
- Göhlmann, H, Weiner, J, 3rd, Schön, A, and Herrmann, R (2000). Identification of a Small RNA within the Pdh Gene Cluster of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Journal of bacteriology* 182.
- Gojobori, T, and Nei, M (1981). Inter-RNA Homology and Possible Roles of Small RNAs. *Journal of molecular evolution* 17.
- Goodfellow, M, and Williams, ST (1983). Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 37.
- Goodrich, JA, and Kugel, JF (2006). Non-Coding-RNA Regulators of RNA Polymerase II Transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7.

- Göpel, Y, Khan, MA, and Gorke, B (2014). Menage a Trois: Post-Transcriptional Control of the Key Enzyme for Cell Envelope Synthesis by a Base-Pairing Small RNA, an RNase Adaptor Protein, and a Small RNA Mimic. *RNA Biol* 11, 433-442.
- Gottelt, M, Kol, S, Gomez-Escribano, JP, Bibb, M, and Takano, E (2010). Deletion of a Regulatory Gene within the Cpk Gene Cluster Reveals Novel Antibacterial Activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 156, 2343-2353.
- Gottesman, S (2005). Micros for Microbes: Non-Coding Regulatory RNAs in Bacteria. *Trends in genetics : TIG* 21, 399-404.
- Gottesman, S, and Storz, G (2011). Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- Grillo, MA, and Colombatto, S (2005). S-Adenosylmethionine and Protein Methylation. *Amino acids* 28, 357-362.
- Guillier, M, Gottesman, S, and Storz, G (2006). Modulating the Outer Membrane with Small RNAs. *Genes & development* 20, 2338-2348.
- Hanahan, D (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166.
- Haneishi, T, Terahara, A, Arai, M, Hata, T, and Tamura, C (1974). New Antibiotics, Methylenomycins a and B. II. Structures of Methylenomycins a and B. *The Journal of antibiotics* 27.
- Hansen, GA, Ahmad, R, Hjerde, E, Fenton, CG, Willassen, NP, and Haugen, P (2012). Expression Profiling Reveals Spot 42 Small RNA as a Key Regulator in the Central Metabolism of *Aliivibrio salmonicida*. *BMC genomics* 13, 37.
- Hartmans, S, de Bont, JAM, and Stackebrandt, E (2006). The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. 889-918.
- Henkin, TM, and Yanofsky, C (2002). Regulation by Transcription Attenuation in Bacteria: How RNA Provides Instructions for Transcription Termination/Antitermination Decisions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 700-707.
- Hershberg, R, Altuvia, S, and Margalit, H (2003). A Survey of Small RNA-Encoding Genes in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 31.
- Hesketh, AR, Chandra, G, Shaw, AD, Rowland, JJ, Kell, DB, Bibb, MJ, and Chater, KF (2002). Primary and Secondary Metabolism, and Post-Translational Protein Modifications, as Portrayed by Proteomic Analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 46.
- Hindle, Z, and Smith, CP (1994). Substrate Induction and Catabolite Repression of the *Streptomyces coelicolor* Glycerol Operon Are Mediated through the Gylr Protein. *Molecular Microbiology* 12.
- Hindley, J (1967). Fractionation of 32p-Labelled Ribonucleic Acids on Polyacrylamide Gels and Their Characterization by Fingerprinting. *Journal of Molecular Biology* 30.
- Hindra, Moody, MJ, Jones, SE, and Elliot, MA (2014). Complex Intra-Operonic Dynamics Mediated by a Small RNA in *Streptomyces coelicolor*. *PloS one* 9, e85856.
- Hoagland, M, Stephenson, M, Scott, J, Hecht, L, and Zamecnik, P (1958). A Soluble Ribonucleic Acid Intermediate in Protein Synthesis. *The Journal of biological chemistry* 231.
- Hobbs, G, Obanye, AI, Petty, J, Mason, JC, Barratt, E, Gardner, DC, Flett, F, Smith, CP, Broda, P, and Oliver, SG (1992). An Integrated Approach to Studying Regulation of Production of the Antibiotic Methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology* 174.
- Hodgson, DA (2000). Primary Metabolism and Its Control in Streptomycetes: A Most Unusual Group of Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 42.

- Hood, DW, Heidstra, R, Swoboda, UK, and Hodgson, DA (1992). Molecular Genetic Analysis of Proline and Tryptophan Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Interaction between Primary and Secondary Metabolism - a Review. *Gene* 115.
- Hopkins, JF, Panja, S, McNeil, SA, Woodson, SA (2009). Effect of Salt and RNA Structure on Annealing and Strand Displacement by Hfq. *Nucleic Acids Research* 37, 6205-13.
- Hopwood, D, Malpartida, F, Kieser, H, Ikeda, H, Duncan, J, Fujii, I, Rudd, B, Floss, H, and Omura, S (1985). Production of 'Hybrid' Antibiotics by Genetic Engineering. *Nature* 314.
- Hopwood, DA (1960). Phase-Contrast Observations on *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* 22.
- Hopwood, DA (2006). Soil to Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual review of genetics* 40, 1-23.
- Hopwood, DA (2007). Therapeutic Treasures from the Deep. *Nature Chemical Biology* 3.
- Hosie, AHF, Allaway, D, and Poole, PS (2002). A Monocarboxylate Permease of *Rhizobium leguminosarum* Is the First Member of a New Subfamily of Transporters. *Journal of bacteriology* 184, 5436-5448.
- Hu, DS, Hood, DW, Heidstra, R, and Hodgson, DA (1999). The Expression of the Trpd, Trpc and Trpba Genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Is Regulated by Growth Rate and Growth Phase but Not by Feedback Repression. *Mol Microbiol* 32.
- Irnov, I, Sharma, CM, Vogel, J, and Winkler, WC (2010). Identification of Regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* 38, 6637-6651.
- Jakimowicz, D, Gust, B, Zakrzewska-Czerwinska, J, and Chater, KF (2005). Developmental-Stage-Specific Assembly of Parb Complexes in *Streptomyces coelicolor* Hyphae. *Journal of bacteriology* 187, 3572-3580.
- Jiang, J, He, X, and Cane, DE (2006). Geosmin Biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* Germacradienol/Germacrene D Synthase Converts Farnesyl Diphosphate to Geosmin. *J Am Chem Soc* 128.
- Jolkver, E, Emer, D, Ballan, S, Kramer, R, Eikmanns, BJ, and Marin, K (2009). Identification and Characterization of a Bacterial Transport System for the Uptake of Pyruvate, Propionate, and Acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* 191, 940-948.
- Kelemen, G, Zalacain, M, Culebras, E, Seno, E, and Cundliffe, E (1994). Transcriptional Attenuation Control of the Tylosin-Resistance Gene Tlra in *Streptomyces fradiae*. *Mol Microbiol* 14.
- Kern, BA, and Inamine, E (1981). Cystathionine Gamma-Lyase Activity in the Cephamycin C Producer *Streptomyces lactamdurans*. *The Journal of antibiotics* 34.
- Kim, D, Hong, JS, Qiu, Y, Nagarajan, H, Seo, JH, Cho, BK, Tsai, SF, and Palsson, BO (2012). Comparative Analysis of Regulatory Elements between *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by Genome-Wide Transcription Start Site Profiling. *PLoS genetics* 8, e1002867.
- Kim, JN, and Breaker, RR (2008). Purine Sensing by Riboswitches. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100, 1-11.
- Kormanec, J, Homerová, D, Barák, I, and Sevcíková, B (1999). A New Gene, Sigg, Encoding a Putative Alternative Sigma Factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* 172.
- Kruger, K, Grabowski, PJ, Zaug, AJ, Sands, J, Gottschling, DE, and Cech, TR (1982). Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31.
- Kunst, F, Ogasawara, N, Moszer, I, Albertini, AM, Alloni, G, Azevedo, V, Bertero, MG, Bessi res, P, Bolotin, A, Borchert, S, et al. (1997). The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390.

- Labeda, DP, and Lyons, AJ (1992). DNA Relatedness among Strains of the Sweet Potato Pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl Environ Microbiol* 58.
- Labes, G, Bibb, M, and Wohlleben, W (1997). Isolation and Characterization of a Strong Promoter Element from the *Streptomyces ghanaensis* Phage 119 Using the Gentamicin Resistance Gene (Aacc1) of Tn1696 as Reporter. *Microbiology* 143.
- Lakey, JH, Lea, EJ, Rudd, BA, Wright, HM, and Hopwood, DA (1983). A New Channel-Forming Antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) Which Requires Calcium for Its Activity. *Journal of General Microbiology* 129.
- Lease, RA, and Belfort, M (2000). A Trans-Acting RNA as a Control Switch in *Escherichia coli*: Dsra Modulates Function by Forming Alternative Structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9919-9924.
- Lensbouer, JJ, Patel, A, Sirianni, JP, and Doyle, RP (2008). Functional Characterization and Metal Ion Specificity of the Metal-Citrate Complex Transporter from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 190, 5616-5623.
- Liu, MY, Gui, G, Wei, B, Preston, JF, 3rd, Oakford, L, Yüksel, Ü, Giedroc, DP, and Romeo, T (1997). The RNA Molecule CsrB Binds to the Global Regulatory Protein CsrA and Antagonizes Its Activity in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 272.
- Loria, R, Kers, J, and Joshi, M (2006). Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu Rev Phytopathol* 44.
- Majdalani, N, Cunnig, C, Sledjeski, D, Elliott, T, and Gottesmann, S (1998). Dsra RNA Regulates Translation of Rpos Message by an Anti-Antisense Mechanism, Independent of Its Action as an Antisilencer of Transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.
- Mann, M, and Jensen, ON (2003). Proteomic Analysis of Post-Translational Modifications. *Nat Biotechnol* 21.
- Mazza, P, Noens, EE, Schirner, K, Grantcharova, N, Mommaas, AM, Koerten, HK, Muth, G, van Wezel, GP, Wohlleben, W (2006). MreB of *Streptomyces coelicolor* is Not Essential for Vegetative Growth but is Required for the Integrity of Aerial Hyphae and Spores. *Molecular Microbiology* 60 (4), 838-52
- McCarthy, AJ, and Williams, ST (1992). Actinomycetes as Agents of Biodegradation in the Environment - a Review. *Gene* 115.
- McCormick, JR, and Flardh, K (2012). Signals and Regulators That Govern *Streptomyces* Development. *FEMS microbiology reviews* 36, 206-231.
- McVittie, A (1974). Ultrastructural Studies on Sporulation in Wild-Type and White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* 81.
- Mendelovitz, S, and Aharonowitz, Y (1983). β -Lactam Antibiotic Production by *Streptomyces clavuligerus* Mutants Impaired in Regulation of Aspartokinase. *Journal of General Microbiology* 129.
- Merrick, MJ (1976). A Morphological and Genetic Mapping Study of Bald Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* 96, 299
- Merrick, MJ, and Edwards, RA (1995). Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiol Rev* 59.
- Mette, MF, Aufsatz, W, van der Winden, J, Matzke, MA, and Matzke, AJ (2000). Transcriptional Silencing and Promoter Methylation Triggered by Double-Stranded RNA. *The EMBO journal* 19.
- Michaux, C, Verneuil, N, Hartke, A, and Giard, JC (2014). Physiological Roles of Small RNA Molecules. *Microbiology* 160, 1007-1019.
- Mika, F, and Hengge, R (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *International journal of molecular sciences* 14, 4560-4579.

- Mizuno, T, Chou, M-Y, and Inouye, M (1984). A Unique Mechanism Regulating Gene Expression: Translational Inhibition by a Complementary RNA Transcript (miRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81.
- Moazed, D (2009). Small RNAs in Transcriptional Gene Silencing and Genome Defence. *Nature* 457.
- Møller, T, Franch, T, Udesen, C, Gerdes, K, and Valentin-Hansen, P (2002). Spot 42 RNA Mediates Discoordinate Expression of the *E. coli* Galactose Operon. *Genes & development* 16, 1696-1706.
- Montaner, B, and Pérez-Tomás, R (2003). The Prodigiosins: A New Family of Anticancer Drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 3.
- Moody, MJ, Young, RA, Jones, SE, and Elliot, MA (2013). Comparative Analysis of Non-Coding RNAs in the Antibiotic-Producing *Streptomyces* Bacteria. *BMC genomics* 14, 558.
- Morita, R (1985). Starvation and Miniaturisation of Heterotrophs, with Special Emphasis on Maintenance of the Starved Viable State. In *Bacteria in Their Natural Environment*, F.G. Fletcher M, ed. (Academic Press, London), pp. 111-130.
- Morita, T, Maki, K, and Aiba, H (2005). RNase E-Based Ribonucleoprotein Complexes: Mechanical Basis of Mrna Destabilization Mediated by Bacterial Noncoding Rnas. *Genes & development* 19.
- Morris, KV, Chan, SW, Jacobsen, SE, and Looney, DJ (2004). Small Interfering RNA–Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. *Science* 305.
- Mortellaro, A, Songia, S, Gnocchi, P, Ferrari, M, Fornasiero, C, D'Alessio, R, Isetta, A, Colotta, F, and Golay, J (1999). New Immunosuppressive Drug Pnu156804 Blocks Il-2-Dependent Proliferation and Nf-Kb and Ap-1 Activation. *J Immunol* 162, 7102.
- Myronovskiy, M, Welle, E, Fedorenko, V, and Luzhetskyy, A (2011). Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Reporter in Actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* 77, 5370-5383.
- Napoli, S, Pastori, C, Magistri, M, Carbone, GM, and Catapano, CV (2009). Promoter-Specific Transcriptional Interference and C-Myc Gene Silencing by Sirnas in Human Cells. *The EMBO journal* 28.
- Narberhaus, F, Waldminghaus, T, Chowdhury, S (2006). RNA Thermometers. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 3.
- Nitsch, B, and Kutzner, HJ (1968). Ureaseaktivität Bei Streptomyceten. *Zeitschrift für Naturforschung* 23.
- Nodwell, JR, and Losick, R (1998). Purification of an Extracellular Signaling Molecule Involved in Production of Aerial Mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 180.
- Nothaft, H, and Szymanski, CM (2010). Protein Glycosylation in Bacteria: Sweeter Than Ever. *Nature reviews Microbiology* 8, 765-778.
- Nudler, E, and Mironov, AS (2004). The Riboswitch Control of Bacterial Metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 11.
- Ochi, K (1986). Occurrence of the Stringent Response in *Streptomyces* sp. And Its Significance for the Initiation of Morphological and Physiological Differentiation. *Journal of General Microbiology* 132.
- Pabo, CO, and Sauer, RT (1992). Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annual review of biochemistry* 61.
- Paget, MS, Kang, JG, Roe, JH, and Buttner, MJ (1998). Sigr, an RNA Polymerase Sigma Factor That Modulates Expression of the Thioredoxin System in Response to Oxidative Stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The EMBO journal* 17.
- Palade, G (1955). A Small Particulate Component of the Cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* 1.

- Paladini, F, Pollini, M, Sannino, A, and Ambrosio, L (2015). Metal-Based Antibacterial Substrates for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* 16, 1873-1885.
- Pandian, SRK, Deepak, V, Kalishwaralal, K, Viswanathan, P, and Gurunathan, S (2010). Mechanism of Bactericidal Activity of Silver Nitrate - a Concentration Dependent Bi-Functional Molecule. *Braz J Microbiol* 41.
- Panek, J, Bobek, J, Mikulik, K, Basler, M, and Vohradsky, J (2008). Biocomputational Prediction of Small Non-Coding RNAs in *Streptomyces*. *BMC genomics* 9, 217.
- Peer, A, and Margalit, H (2011). Accessibility and Evolutionary Conservation Mark Bacterial Small-RNA Target-Binding Regions. *Journal of bacteriology* 193, 1690-1701.
- Pollini, M, Paladini, F, Sannino, A, Picca, RA, Sportelli, MC, Cioffi, N, Nitti, MA, Valentini, M, and Valentini, A (2015). Nonconventional Routes to Silver Nanoantimicrobials: Technological Issues, Bioactivity, and Applications. In *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*, R.M. Kon K, ed. (Elsevier), pp. 87-105.
- Prelich, G (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics* 190, 841-854.
- Procopio, RE, Silva, IR, Martins, MK, Azevedo, JL, and Araujo, JM (2012). Antibiotics Produced by *Streptomyces*. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 16, 466-471.
- Quintana, ET, Wierzbicka, K, Mackiewicz, P, Osman, A, Fahal, AH, Hamid, ME, Zakrzewska-Czerwinska, J, Maldonado, LA, and Goodfellow, M (2008). *Streptomyces sudanensis* sp. Nov., a New Pathogen Isolated from Patients with Actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 305-313.
- Racz, Z, Kaucsar, T, and Hamar, P (2011). The Huge World of Small RNAs: Regulating Networks of MicroRNAs (Review). *Acta physiologica Hungarica* 98, 243-251.
- Raghavan, R, Groisman, EA, and Ochman, H (2011). Genome-Wide Detection of Novel Regulatory RNAs in *E. coli*. *Genome research* 21, 1487-1497.
- Repoila, F, and Darfeuille, F (2009). Small Regulatory Non-Coding RNAs in Bacteria: Physiology and Mechanistic Aspects. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 101, 117-131.
- Repoila, F, Majdalani, N, and Gottesmann, S (2003). Small Non-Coding RNAs, Co-Ordinators of Adaptation Processes in *Escherichia coli*: The Rpos Paradigm. *Molecular Microbiology* 48.
- Reuther, J (2008). Stickstoffassimilation in Actinobakterien. *Biospektrum* 14.
- Reuther, J, and Wohlleben, W (2007). Nitrogen Metabolism in *Streptomyces coelicolor*: Transcriptional and Post-Translational Regulation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 12, 139-146.
- Romero-Rodriguez, A, Robledo-Casados, I, and Sanchez, S (2015). An Overview on Transcriptional Regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et biophysica acta* 1849, 1017-1039.
- Rudd, BAM, and Hopwood, DA (1980). A Pigmented Mycelial Antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: Control by a Chromosomal Gene Cluster. *Journal of General Microbiology* 119.
- Ryding, NJ, Bibb, MJ, Molle, V, Findlay, KC, Chater, KF, Buttner, MJ (1999). New Sporulation Loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 181, 5419.
- Sauter, C, Basquin, J, Suck, D (2003). Sm-like Proteins in Eubacteria: the Crystal Structure of the Hfq Protein From *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 31, 4091.
- Schmidt, M, Zheng, P, and Delilhas, N (1995). Secondary Structures of *Escherichia coli* Antisense Micf RNA, the 5'-End of the Target Ompf Mrna, and the RNA/RNA Duplex. *Biochemistry* 34.

- Schrempf, H (2001). Recognition and Degradation of Chitin by Streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* 79.
- Sharma, CM, and Vogel, J (2009). Experimental Approaches for the Discovery and Characterization of Regulatory Small RNA. *Current opinion in microbiology* 12, 536-546.
- Sittka, A, Lucchini, S, Papenfort, K, Sharma, CM, Rolle, K, Binnewies, TT, Hinton, JC, and Vogel, J (2008). Deep Sequencing Analysis of Small Noncoding RNA and mRNA Targets of the Global Post-Transcriptional Regulator, Hfq. *PLoS genetics* 4, e1000163.
- Skippington, E, and Ragan, MA (2012). Evolutionary Dynamics of Small RNAs in 27 *Escherichia coli* and *Shigella* Genomes. *Genome biology and evolution* 4, 330-345.
- Sonnleitner, E, Sorger-Domenigg, T, Madej, MJ, Findeiss, S, Hackermuller, J, Huttenhofer, A, Stadler, PF, Blasi, U, and Moll, I (2008). Detection of Small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by RNomics and Structure-Based Bioinformatic Tools. *Microbiology* 154, 3175-3187.
- Stackebrandt, E, and Woese, CR (1981). Towards a Phylogeny of the Actinomycetes and Related Organisms. *Current Microbiology* 5.
- Storz, G, Altuvia, S, and Wassarman, KM (2005). An Abundance of RNA Regulators. *Annual review of biochemistry* 74, 199-217.
- Storz, G, Opdyke, JA, and Zhang, A (2004). Controlling mRNA Stability and Translation with Small, Noncoding RNAs. *Current opinion in microbiology* 7, 140-144.
- Sun, X, Zhulin, I, and Wartell, RM (2002). Predicted Structure and Phyletic Distribution of the RNA-Binding Protein Hfq. *Nucleic acids research* 30.
- Swiercz, JP, Hindra, Bobek, J, Bobek, J, Haiser, HJ, Di Berardo, C, Tjaden, B, and Elliot, MA (2008). Small Non-Coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic acids research* 36, 7240-7251.
- Tarkka, M, and Hampp, R (2008). Chapter 6: Secondary Metabolites of Soil Streptomycetes in Biotic Interactions. In *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, P. Karlovsky, ed. (Springer).
- Tezuka, T, Hara, H, Ohnishi, Y, and Horinouchi, S (2009). Identification and Gene Disruption of Small Noncoding RNAs in *Streptomyces griseus*. *Journal of bacteriology* 191, 4896-4904.
- Thomson, DW, Bracken, CP, and Goodall, GJ (2011). Experimental Strategies for MicroRNA Target Identification. *Nucleic acids research* 39, 6845-6853.
- Trotochaud, AE, and Wassarman, KM (2005). A Highly Conserved 6s RNA Structure Is Required for Regulation of Transcription. *Nature structural & molecular biology* 12, 313-319.
- Udekwu, K, Darfeuille, F, Vogel, J, Reimegård, J, Holmqvist, E, and Wagner, EG (2005). Hfq-Dependent Regulation of Ompa Synthesis Is Mediated by an Antisense RNA. *Genes & development* 19.
- Urban, JH, and Vogel, J (2007). Translational Control and Target Recognition by *Escherichia coli* Small RNAs in Vivo. *Nucleic acids research* 35, 1018-1037.
- Ventura, M, Canchaya, C, Tauch, A, Chandra, G, Fitzgerald, GF, Chater, KF, and van Sinderen, D (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71, 495-548.
- Viollier, PH, Minas, W, Dale, GE, Folcher, M, and Thompson, CJ (2001a). Role of Acid Metabolism in *Streptomyces coelicolor* Morphological Differentiation and Antibiotic Biosynthesis. *Journal of bacteriology* 183, 3184-3192.
- Viollier, PH, Nguyen, KT, Minas, W, Folcher, M, Dale, GE, and Thompson, CJ (2001b). Roles of Aconitase in Growth, Metabolism, and Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* 183, 3193-3203.

- Vockenhuber, M-P, Sharma, CM, Statt, MG, Schmidt, D, Xu, Z, Dietrich, S, Liesegang, H, Mathews, DH, and Suess, B (2011). Deep Sequencing-Based Identification of Small Non-Coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *RNA Biology* 8, 468-477.
- Vockenhuber, MP, Heueis, N, and Suess, B (2015). Identification of Mete as a Second Target of the sRNA scr5239 in *Streptomyces coelicolor*. *PloS one* 10.
- Vockenhuber, MP, and Suess, B (2012). *Streptomyces coelicolor* sRNA scr5239 Inhibits Agarase Expression by Direct Base Pairing to the Daga Coding Region. *Microbiology* 158, 424-435.
- Vogel, J, and Luisi, BF (2011). Hfq and its Constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology* 9, 578-89.
- Vogel, J, and Sharma, CM (2005). How to Find Small Non-Coding RNAs in Bacteria. *Biological chemistry* 386, 1219-1238.
- Volff, JN, and Altenbuchner, J (1998). Genetic Instability of the *Streptomyces* Chromosome. *Molecular Microbiology* 27.
- Wagner, EG, Altuvia, S, and Romby, P (2002). Antisense RNAs in Bacteria and Their Genetic Elements. *Advances in genetics* 46.
- Wagner, EG, and Romby, P (2015). Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. *Advances in genetics* 90, 133-208.
- Waksman, S, and Henrici, A (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *Journal of bacteriology* 46.
- Waldvogel, E, Herbig, A, Battke, F, Amin, R, Nentwich, M, Nieselt, K, Ellingsen, TE, Wentzel, A, Hodgson, DA, Wohlleben, W, *et al.* (2011). The Pii Protein GlnK Is a Pleiotropic Regulator for Morphological Differentiation and Secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* 92, 1219-1236.
- Wassarman, KM (2007). 6s Rna: A Small RNA Regulator of Transcription. *Current opinion in microbiology* 10, 164-168.
- Wassarman, KM, and Saecker, RM (2006). Synthesis-Mediated Release of a Small RNA Inhibitor of RNA Polymerase. *Science* 314.
- Wassarman, KM, and Storz, G (2000). 6s RNA Regulates *E. coli* RNA Polymerase Activity. *Cell* 101.
- Waters, LS, and Storz, G (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136, 615-628.
- Watve, MG, Tickoo, R, Jog, MM, and Bhole, BD (2001). How Many Antibiotics Are Produced by the Genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology* 176, 386-390.
- Weinberg, ED (1990). Roles of Trace Metals in Transcriptional Control of Microbial Secondary Metabolism. *Biol Metals* 2.
- Williams, ST (1990). Actinomycetes- the Ray Fungi. *Mycologist* 4.
- Windbichler, N, von Pelchrzim, F, Mayer, O, Csaszar, E, and Schroeder, R (2008). Isolation of Small RNA-Binding Proteins from *E. coli*: Evidence for Frequent Interaction of RNAs with RNA Polymerase. *RNA Biology* 5, 30-40.
- Witt, D, and Stackebrandt, E (1990). Unification of the Genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and Amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339a. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 361.
- Wright, PR, Georg, J, Mann, M, Sorescu, DA, Richter, AS, Lott, S, Kleinkauf, R, Hess, WR, and Backofen, R (2014). CopraRNA and IntaRNA: Predicting Small RNA Targets, Networks and Interaction Domains. *Nucleic acids research* 42, W119-123.

- Wood, TK (2009). Insights of *Escherichia coli* Biofilm Formation and Inhibition from Whole-Transcriptome Profiling. *Environmental Microbiology* 11, 1-15.
- Yagüe, P, Rodríguez-García, A, López-García, MT, F, MJ, Rioseras, B, Sánchez, J, and Manteca, A (2013). Transcriptomic Analysis of *Streptomyces coelicolor* Differentiation in Solid Sporulating Cultures: First Compartmentalized and Second Multinucleated Mycelia Have Different and Distinctive Transcriptomes. *PloS one* 8.
- Zhang, A, Altuvia, S, Tiwari, A, Argaman, L, Hengge-Aronis, R, and Storz, G (1998). The Oxys Regulatory RNA Represses Rpos Translation and Binds the Hfq (Hf-I) Protein. *The EMBO journal* 17.
- Zhang, A, Wassarman, KM, Ortega, J, C, SA, and Storz, G (2002). The Sm-Like Hfq Protein Increases Oxys RNA Interaction with Target Mrnas. *Molecular Cell* 9.
- Zhang, A, Wassarman, KM, Rosenow, C, Tjaden, BC, Storz, G, and Gottesman, S (2003). Global Analysis of Small RNA and mRNA Targets of Hfq. *Molecular Microbiology* 50, 1111-1124.
- Zhang, H, Wu, M, and Sen, A (2012). Silver Nanoparticle Antimicrobials and Related Materials. In *Nano-Antimicrobials Progress and Prospects*, R.M. Cioffi N, ed. (Springer-Verlag).
- Zhang, Y, Zhang, Z, Ling, L, Shi, B, and Chen, R (2004). Conservation Analysis of Small RNA Genes in *Escherichia coli*. *Bioinformatics* 20, 599-603.

8 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

NAME	NONA HEUEIS
ANSCHRIFT	LÄRCHENWEG 7, 61440 OBERURSEL
KONTAKT	NONA-HEUEIS@WEB.DE
GEBURTSDATUM UND -ORT	11.10.1984, FRANKFURT AM MAIN

BERUFSERFAHRUNG

SEIT 07/2012	WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITERIN, TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT
--------------	---

HOCHSCHULAUSBILDUNG

SEIT 04/2012	PROMOTIONSSTUDIUM „CHARAKTERISIERUNG KLEINER, NICHT-KODIERENDER sRNAs IN <i>S. COELICOLOR</i> “ TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT UND GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT ARBEITSKREIS PROF. DR. SÜß: SYNTHETISCHE GENETISCHE SCHALTkreISE VORRAUSSICHTLICHES ENDE: DEZEMBER 2015
--------------	--

02/2011 – 01/2012	DIPLOMARBEIT „CHARAKTERISIERUNG KLEINER, NICHT-KODIERENDER sRNAs IN <i>S. COELICOLOR</i> “ INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOWISSENSCHAFTEN, GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT ARBEITSKREIS PROF. DR. SÜß: RNA-BIOCHEMIE
-------------------	---

10/2005 – 01/2012	STUDIUM DER BIOLOGIE, GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT HAUPTFÄCHER: GENETIK, BIOCHEMIE, FORENSISCHE BIOLOGIE
-------------------	--

01/2010 – 07/2010	AUSLANDSAUFENTHALT: UNIVERSITÄT I Tromsø, NORWEGEN BELEGTE KURSE: RNA BIOLOGY, ARCTIC BIOLOGY, MICROSCOPY IMAGING TECHNIQUES
-------------------	---

SCHULBILDUNG

09/1995 - 07/2004	ERNST-LUDWIG-SCHULE, BAD NAUHEIM ABSCHLUSS: ALLGEMEINE HOCHSCHULREIFE
-------------------	---

09/1991 – 07/1995	GRUNDSCHULE OBERURSEL-OBERSTEDTEN, OBERURSEL
-------------------	---

Oberursel, den 15.11.2015

9 Publikationen

Vockenhuber, MP, Heueis, N, and Suess, B (2015). Identification of metE as a Second Target of the sRNA scr5239 in *Streptomyces coelicolor*. PloS one 10(3): e0120147.

Heueis, N, Vockenhuber, MP, and Suess, B (2014). Small Non-Coding RNAs in Streptomyces. RNA Biology, 11(5): 464-469

10 Vorträge und Posterbeiträge

33. Rabensteiner Kolleg (2015); Pottenstein, Deutschland

Vortrag: Kleine, nicht-kodierende RNAs in *S. coelicolor*

Winterschule des SFB902 (2015); Obergurgl, Österreich

Vortrag: Small non-coding RNAs in *S. color*

Winterschule des SFB902 (2014); Obergurgl, Österreich

Vortrag: Small non-coding RNAs in *S. color*

Regulating with RNA in bacteria (2013); Würzburg, Deutschland

Posterpräsentation: Small non-coding RNAs in *S. coelicolor*

Winterschule des SFB902 (2013); Obergurgl, Österreich

Vortrag: Small non-coding RNAs in *S. coelicolor*

RNA-Club (2012); Frankfurt am Main, Deutschland

Moderation

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sowie sämtliche von anderen direkt oder indirekt übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den _____.____._____

.....

Nona Heueis